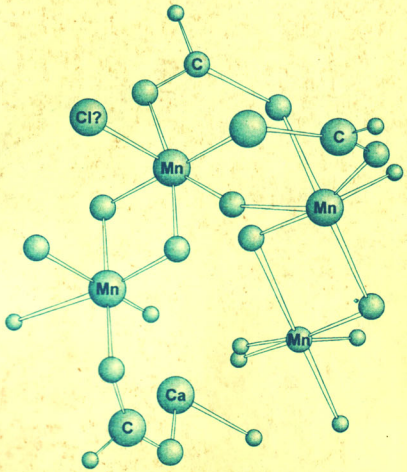
Mircea Nicolae Palamaru
Alexandra Raluca Iordan Alexandru Cecal

Chimie bioanorganică generală



Tu 40. 087

EDITURA UNIVERSITĂȚII „ALEXANDRU IOAN CUZA" IAȘI

Mircea Nicolae Palamaru

Alexandra Raluca Iordan Alexandru Cecal

Chimie bioanorganică generală

ISBN 973-9312-34-9

© Editura Universităţii „Al. I. Cuza“, 1998
6600 – Iaşi, Păcurari n° 9, tel. 032-114947

Mircea Nicolae Palamaru

Alexandra Raluca Iordan Alexandru Cecal

Chimie bioanorganică generală

Editura Universităţii „Alexandru Ioan Cuza“
Iaşi – 1998

Referenți:

Prof. dr. I. BERDAN
Universitatea „Al. I. Cuza" Iaşi

Acad. V. RUDIC
Academia de Ştiințe a Republicii Moldova

PREFAŢĂ

Chimia bioanorganică este unul din cele mai noi domenii studiate în cadrul chimiei anorganice. Menirea ei este de a identifica compuşii anorganici implicaţi în diferite procese biologice, de a studia aceşti compuşi, de a modela chimic şi matematic sistemele biologice ce îi conţin şi în final de a controla şi optimiza astfel de sisteme.

Autorii, cadre didactice în învăţământul superior, la Facultatea de Chimie a Universităţii "Alexandru Ioan Cuza" din Iaşi, prezintă cu pasiune şi competenţă aspecte deosebit de interesante din domeniul chimiei bioanorganice. Cele peste 300 de pagini sunt redactate într-un stil clar şi concis. Materialul reprezintă de fapt o dezvoltare a cursurilor predate studenţilor de la secţiile de Biochimie tehnologică şi Chimie, unde chimia bioanorganică constituie disciplină de studiu.

După o prezentare generală a domeniului, sunt abordate o serie de aspecte legate de principalii liganzi cu activitate biologică, caracteristicile generale ale compuşilor coordinativi ai biometalelor cu bioliganzii, precum şi legăturile chimice care se pot realiza în aceste sisteme. Se continuă cu metodele utilizate în studiul structurii acestor compuşi, funcţiile biologice ale bioelementelor, rolul de catalizatori ai metaloenzimelor în procesele hidrolitice şi cu transfer de electroni, aspecte legate de compuşii de coordinaţie ai acizilor nucleici cu biocationii, ca în final să se prezinte şi principalele direcţii de aplicare a chimiei bioanorganice la acest sfârşit de secol.

Referitor la funcţiile biologice ale bioelementelor se discută pe rând funcţiile biologice ale biocationilor din blocurile s şi d. Autorii scot în evidenţă cu profesionalism aspectele cele mai importante şi interesante din punct de vedere ştiinţific.

Cartea tratează uneori şi aspecte mai greu de citit şi înţeles pentru cititorul neavizat, apelându-se la o serie de cunoştinţe din domeniul chimiei compuşilor coordinativi şi unele metode fizico-chimice de analiză mai puţin cunoscute, dar aceste noţiuni sunt utilizate numai atunci când a fost absolut necesar. Nu poţi scrie şi crea într-un domeniu de vârf fără să utilizezi tot ce este actual la momentul respectiv.

Cartea se adresează atât cercetătorului în domeniu, dar şi specialiştilor din domenii înrudite, care abordează din alte puncte de vedere problemele vieţii cum ar fi agronomia, biologia, biochimia, biofizica, medicina etc.

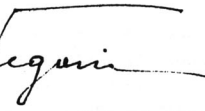
Sunt prezentate sistemele metaloenzimatice, catalizatori ai proceselor hidrolitice şi redox, punându-se accent pe biocationi care reprezintă centrul activ al acestora. Se arată că imitarea structurii şi a proprietăţilor acestor biocatalizatori, respectiv biomimetizarea lor este încă la început de drum, dar în laboratoarele de specialitate se obţin în prezent succese importante. Astfel sunt prezentate o serie de încercări şi reuşite în reproducerea în mare măsură atât a structurii electronice cât şi a geometriei unor centri activi catalitic cum ar fi cei din metanmonoxigenază, catalază, clusterii fer-sulf şi mangan-oxo implicaţi în procesele de fotosinteză sau clusterii fer-oxo implicaţi în procesele de activare a moleculei de dioxigen.

Prin conţinutul ei lucrarea "CHIMIE BIOANORGANICĂ GENERALĂ" elaborată de dr. chim. Mircea Nicolae PALAMARU, dr. chim. Alexandra Raluca IORDAN şi dr. chim. Alexandru CECAL, împreună cu cartea "CHIMIE BIOANORGANICĂ ŞI METALELE VIEŢII" elaborată de aceeaşi colectiv de autori şi apărută în anul 1997 la Editura BIT din Iaşi, constituie un material valoros cu caracter de noutate în literatura chimică românească adresându-se tuturor celor interesaţi de problematica lumii vii şi în special studenţilor facultăţilor de profil.

Prin apariţia acestei cărţi, literatura de specialitate se va completa cu un material caracterizat prin rigoare ştiinţifică şi un înalt grad de originalitate.

Bucureşti 2 aprilie 1998

Profesor dr. docent Dumitru NEGOIU



Universitatea Bucureşti, Facultatea de Chimie

CUVÂNT ÎNAINTE,

Chimia bioanorganică a apărut din conştientizarea faptului că organismele vii au nevoie pentru a se perpetua în mod continuu şi de alte elemente decât cele organogene. Aceste elemente sunt necesare tuturor formelor cunoscute de viaţă. Ca orice ramură a chimiei, chimia bioanorganică dezvoltă două aspecte importante: analiza şi sinteza compuşilor anorganici şi a compuşilor coordinativi ai bicationilor implicaţi în procesele vieţii. Scopul analizei în acest domeniu se referă la identificarea şi cunoaşterea rolului celor 24 de elemente chimice din sistemul periodic prezente în lumea vie, iar scopul sintezei este a reproduce caracteristicile combinaţiilor acestora implicate în procesele vieţii, în condiţii de laborator. Imitarea structurii şi proprietăţilor acestora, respectiv biomimetizarea lor este încă la început, dar în laboratoarele de specialitate se obţin succese importante pentru reproducerea structurii şi proprietăţilor centrilor activi ai unor enzime cu funcţii biologice importante cum ar fi: reproducerea structurii electronice a clusterilor fer-sulf şi a clusterilor mangan-oxo implicaţi în procesele de fotosinteză, reproducerea structurii clusterilor fer-oxo implicaţi în procesele de activare a dioxigenului, reproducerea centrului activ din metanmonoxigenază, catalază, modele pentru bleomicină etc. Biomimetizarea a implicat o dezvoltare puternică a sintezei în domeniul chimiei bioanorganice. Reproducerea unui sistem natural este deosebit de complexă, mai ales în cazul când scopul său este un aspect multifuncţional. S-au obţinut deja rezultate foarte bune în cazul în care atenţia s-a concentrat asupra unei singure funcţii biologice. Din punct de vedere practic rezultatele sunt mai bune decât cele ale sistemului viu (polifuncţional), care a putut fi optimizat prin selecţie naturală, dar nu pentru fiecare funcţie în parte.

Cartea de faţă reprezintă o continuare şi o completare a informaţiei prezentate de autori în cartea "Chimie bioanorganică şi metalele vieţii" apărută în Editura BIT, Iaşi 1997. În această carte sunt prezentate aspecte legate de metode clasice şi moderne de investigare a structurii şi proprietăţilor compuşilor coordinativi implicaţi în procesele vieţii,

mecanismele proceselor hidrolitice şi redox, compuşii de coordinaţie ai acizilor nucleici, aplicaţiile actuale ale chimiei bioanorganice.

Pentru elaborarea acestei cărţi unul dintre autori a efectuat două stagii de documentare la Universitatea Paris-Sud Orsay, Franţa unde s-a încercat aducerea la zi a informaţiei din domeniu. De un real folos au fost discuţiile purtate cu Dr. Jean-Jacques GIRERD, directorul Laboratorului de Chimie anorganică, specialist de marcă în domeniul chimiei bioanorganice şi căruia dorim să-i mulţumim pentru ajutorul acordat. Dorim de asemenea să le mulţumin referenţilor pentru amabilitatea de a citi manuscrisul şi pentru sugestiile făcute.

Autorii sunt conştienţi că din cauza complexităţii informaţiei poate nu au fost prezentate toate aspectele care ar putea interesa. Vom fi recunoscători tuturor colegilor care ne vor semnala eventualele scăpări sau care ne vor da sugestii ce ne vor fi de un real folos în eventualitatea apariţiei unei noi ediţii.

Autorii

Iaşi, 1998

CAPITOLUL I

INTRODUCERE

I.1. Chimia organică şi anorganică

In mod tradiţional specialiştii considerau că chimia organică este chimia vieţii, iar chimia anorganică este chimia lumii neînsufleţite. În consecinţă, elementele chimice au fost repartizate în mod inegal între universul lumii vii şi universul lumii neînsufleţite, cele două ramuri ale chimiei fiind definite de specialiştii din domeniu care lucrează la sinteza sau analiza combinaţiilor chimice, după elementele chimice care intră în componenţa moleculelor.

Numai patru elemente chimice formează 99% din atomii care întră în componenţa corpului omenesc. Acestea sunt hidrogenul (62.8%), oxigenul (25.4%), carbonul (9.4%) şi azotul (1.4%). Restul de 1% îl reprezintă alte elemente chimice. Procentajul important în hidrogen şi oxigen este datorat abundenţei apei în ţesuturile vii.

Moleculele care conţin unele din aceste patru elemente, sau pe toate patru, sunt zaharidele şi aminoacizii, care contribuie şi ele în mod substanţial la realizarea acestui procent. Deci, se înţelege că iniţial chimia organică a fost confundată cu studiul moleculelor formate prin combinarea elementelor C,H, N şi O.

Majoritatea celorlalte elemente din sistemul periodic nu sunt întâlnite decât în lumea minerală. Chimia anorganică a putut fi definită ca studiul compuşilor care conţin eventual elementele precedente (C, H, N şi O) şi de asemenea alte elemente.

Astăzi, din cele două definiţii, prima cu siguranţă nu mai este valabilă, iar a doua în cel mai bun caz poate fi luată în consideraţie cu aproximaţie.

Dacă chimia organică se ocupă în principal de studiul moleculelor formate de carbon, hidrogen, azot şi oxigen, ea nu se mai confundă cu studiul proceselor chimice implicate în procesele vieţii şi are ca obiect de studiu multe alte molecule, cum ar fi moleculele active în optica neliniară, cristalele lichide, molecule conductoare şi supraconductoare şi în ultimul timp fantastica arhitectură a C_{60} şi a derivaţilor lor.

Chimia anorganică studiază cu certitudine o mare varietate de elemente întâlnite în lumea minerală, dar ea a evoluat de asemenea incluzând în spectrul său de preocupări şi lumea vie.

I.2. Chimia bioanorganică

Chimia bioanorganică a apărut tocmai din conştientizarea faptului că organismul viu are nevoie şi de alte elemente decât carbonul, hidrogenul, azotul şi oxigenul. Aici se pot distinge două categorii. Mai întâi aceste elemente prezente în cantităţi mult mai mici decât cele patru elemente majoritare, totalul lor atingând la om totuşi 1% din atomi. Aceste elemente sunt necesare tuturor formelor cunoscute de viaţă.

A doua categorie este formată din elemente prezente în cantităţi încă şi mai mici (de unde şi numele lor de oligoelemente) dar absolut indispensabile. Este cazul vanadiului, cromului, manganului, ferului, cobaltului, nichelului, cuprului, zincului, molibdenului, borului, siliciului, seleniului, fluorului, iodului şi poate a arsenului, bromului şi staniului. Intervenţia ultimelor trei elemente în procesele vieţii nu a fost încă definitiv probată. Nu orice formă de viaţă are nevoie de toate aceste elemente ci numai de câte o parte din ele. Aceste consideraţii sunt rezumate în tabelul I.1.

Ferul este fără îndoială unul din oligoelementele cu rolul cel mai cunoscut în fenomenele vieţii. Tabelul I.2. prezintă abundenţa acestui element în corpul omenesc. 65% din acest element este situat în hemoglobină şi 6% în a doua proteină care serveşte la fixarea dioxigenului: mioglobina. 13% şi 12% din fer este stocat în feritină şi respectiv hemosiderină.

Tabel I.1. Elementele esențiale vieții

	1 IA	2 IIA	3 IIIB	4 IVB	5 VB	6 VIB	7 VIIB	8	9 VIIIB	10	11 IB	12 IIB	13 IIIA	14 IVA	15 VA	16 VIA	17 VIIA	18 VIIIA
1							*H*											He
2	Li	Be											*B*	*C*	*N*	*O*	*F*	Ne
3	*Na*	*Mg*											Al	*Si*	*P*	*S*	*Cl*	Ar
4	*K*	*Ca*	Sc	Ti	*V*	*Cr*	*Mn*	*Fe*	*Co*	*Ni*	*Cu*	*Zn*	Ga	Ge	*As*	*Se*	*Br*	Kr
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	*Mo*	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	*Sn*	Sb	Te	*I*	Xe
6	Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
7	Fr	Ra	Ac	Rf	Ha	Sb	Nb	Hs	Mt	Und								
				Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu	
				Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr	

E: Elemente în cantitate mare în mediile biologice

E: Elemente în urme considerate esențiale pentru plante sau animale

E: Elemente în urme care probabil sunt esențiale

Tabel I.2. Distribuţia proteinelor cu fer pentru un adult normal

Proteina	Masa moleculară a proteinei	Cantitatea de proteină în organism, g	Cantitatea de fer, g	Procentul din ferul din corp	Tipul de fer : hemic (H) sau nonhemic(N)	Numărul de atomi de fer legaţi într-o moleculă	Starea de oxidare a ferului	Funcţia în organism a proteinei
Hemoglobina	645000	750	2,600	65,00	H	4	Fe^{2+}	Transportul oxigenului în plasmă
Mioglobina	17000	40	0,130	6,00	H	1	Fe^{2+}	Stocarea oxigenului în muşchi
Transferina	76000	20	0,007	0,20	N	2	Fe^{3+}	Transportul ferului prin plasmă
Feritina	444000	2,4	0,520	13,00	N	0-4500	Fe^{3+}	Stocarea ferului în celulă
Hemosiderina	necunoscută	1,6	0,480	12,00	N	5000	Fe^{3+}	Stocarea ferului în celulă
Catalaza	280000	5,0	0,004	0,10	H		Fe^{2+}	Metabolismul apei oxigenate
Citocrom C	125000	0,8	0,004	0,10	H	1	Fe^{2+}/Fe^{3+}	Oxidare terminală
Peroxidaza	441000				H			Metabolismul apei oxigenate
Citocromi şi oxidaze			0,020	0,05	H		Fe^{2+}/Fe^{3+}	Oxidare terminală
Flavoproteine dehidroxigenaze, oxidaze şi oxigenaze					N		Fe^{2+}	Reacţii de oxidare, încorporarea oxigenului molecular

Structura feritinei este prezentată în figura I.1.; această proteină conține 24 de unități monomere, astfel dispuse încât închide o cavitate importantă în centrul volumului pe care îl delimitează. În acest volum pot fi stocați până la 4500 atomi de fer.

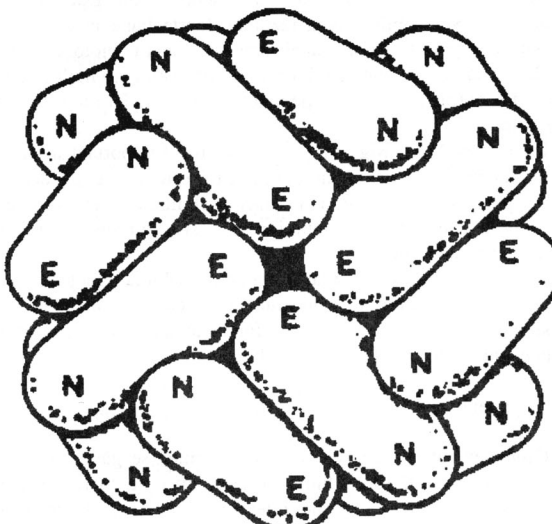


Figura I.1. Structura cuaternară a feritinei. În centrul volumului delimitat de cele 24 de unități polipeptidice pot fi stocați până la 4500 atomi de fer.

În alte enzime, absolut vitale cum ar fi citocromii, cantitățile de fer sunt mult mai reduse. În hemoglobină, mioglobină și citocromi, un atom de fer este legat de o grupare de natură organică particulară, porfirina. Ansamblul atom de fer+porfirină se numește hem. Chimia porfirinelor de fer este foarte vastă și dezvoltările sale au fost motivate cu prisosință de dorința chimiștilor de a imita prin sinteză aceste sisteme naturale.

Ca orice ramură a chimiei, chimia bioanorganică comportă două aspecte: analiză și sinteză. Scopul analizei este cunoașterea rolului celor 24 de elemente în sistemele vii, iar scopul celui de al doilea aspect este de a

încerca să le reproducă caracteristicile în laborator. Imitația, respectiv biomimetizarea este încă săracă (departe de structura compușilor naturali), dar tocmai acestă importantă sarcină dă un elan extraordinar chimiei bioanorganice. Reproducerea unui sistem natural este deosebit de complexă, mai ales în cazul în care scopul său este un aspect multifuncțional. S-au obținut deja rezultate foarte bune în cazul în care atenția s-a concentrat asupra unei singure funcții biologice. Uneori rezultatele par să fie mai bune decât cele ale sistemului viu multifuncțional, care a putut fi optimizat prin selecție naturală globală, dar nu în fiecare din funcțiile sale.

Ionii de Na^+, K^+, Mg^{2+} și Ca^{2+} joacă un rol important în procesele biologice, dar modelarea chimică a acestui rol este încă puțin dezvoltată. Viitorul ar putea să fie extraordinar pentru o chimie care să mimeze rolul acestor ioni în activitatea sistemului nervos și a diferitelor procese de reglare în care ei sunt implicați.

În cartea de față s-a acordat o atenție deosebită oligoelementelor de tip metalic: vanadiul, cromul, manganul, ferul, cobaltul, nichelul, cuprul, zincul și molibden. Ele joacă un rol fundamental mai ales în reacțiile enzimatice, chimia lor fiind deosebit de bogată.

I.3. Oligoelemente

Oligoelementele, sau "elementele în urme" se găsesc în sistemul periodic în număr de 92 (de la hidrogen la uraniu). Se poate considera că aproape toate elementele naturale intervin pe de o parte în structura generală a organismelor și pe de altă parte ele joacă apoi roluri specifice importante (chimice, fizice și informaționale).

Cea mai mare parte a oligoelementelor pot fi determinate calitativ și cantitativ prin tehnici de spectroscopie atomică (emisie și absorbție).

Oligoelementele sunt catalizatori biologici indispensabili, acțiunile lor fiind legate de proteine și de metaloenzime specifice (E-M-S, enzimă-metal-substrat). De altfel ele au fost reperate în lichide biologice și țesuturi, precum și în derivatele protectoare ale epidermei (păr, unghii, pene, copite).

Pentru ca un element să fie considerat oligoelement, trebuie ca acesta să nu se găsească în lichidele biologice într-o concentrație mai mare de 1 mg/l. Astfel, magneziul a cărui concentrație în lichidele biologice variază între 25 și 50 mg/l nu poate să fie considerat ca un oligoelement ci

ca un macroelement. Siliciul, element important pentru organism, este la limita caracterului de oligoelement, deoarece în urină se găseşte într-o concentraţie de 0,7 ÷ 1,5 mg/l.

I.4. Macroelemente

Macroelemente sunt sodiu, potasiu, calciu, magneziu, fosfor.

Viaţa biologică pare a se baza pe fenomene în competiţie genetică (catabolice şi metabolice). Oligoelementele joacă un rol capital în mecanismele proteice, enzimatice şi genetice pentru că destul de recent a fost demonstrat faptul că ARN_m-ul este o enzimă.

Progresele recente ale tehnicilor de spectroscopie atomică permit determinarea cantitativă a majorităţii elementelor conţinute în lichidele biologice.

I.5. Perspective ale elementelor esenţiale, în urme

Dezvoltarea deosebită a biologiei moleculare a avut în contrapartidă o creştere impresionantă a informaţiilor din domeniul biologiei. Ultimele decenii au fost martorele unei creşteri explozive în cunoaşterea numeroaselor elemente care sunt esenţiale vieţii şi în perpetuarea continuă pe tera a plantelor şi animalelor. Aceste cercetări însoţesc subiectul, care în mod frecvent este identificat sub denumirea de chimie bioanorganică şi de cercetarea elementelor în urme.

Tabelul I.3. Clasificarea elementelor esenţiale.

Criteriul de clasificare	Elemente
Blocul elementelor structurale	H, C, N, O, P, S
Macroelemente	Na, K, Mg, Ca, Cl, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}
Elemente în urme	Fe, Zn, Cu

În tabelul I.2. sunt prezentate 30 de elemente esenţiale, care includ şase elemente de susţinere sau structurale, 5 macroelemente şi 19 elemente în urme. Cantitatea prezentă a celor 11 elemente structurale comune, care în corpul omenesc reprezintă peste 99% din atomi, este prezentată în figura 2. După fer şi fluor, celelalte elemente în urme apar în concentraţii

mai mici. Cele 19 elemente în urme includ ferul, zincul si cuprul, cele mai importante metale ca activitate biologică. Oricare din celelalte elemente esențiale sunt considerate microurme, pentru că în corpul uman adult se află sub 10 mg, cu excepția fluorului și borului. Poziția lor în sistemul periodic al elementelor este indicată în figura I.2

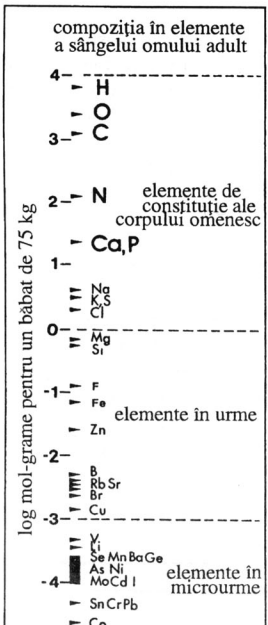


Figura I.2. Compoziția chimică în elemente a omului adult, în scară logaritmică.

Istoricul descoperirii elementelor esențiale în urme a fost prezentat de Schrauzer. Cunoașterea funcției biologice a elementelor în urme se bazează în mare măsură pe înțelegerea chimiei lor. Tratamentul anemiei cu fer si asocierea deficitului de iod cu gușa, sunt numai două exemple de elemente în urme, recunoscute ca esențiale pentru organism, în secolul XX. Experimente efectuate anterior pe plante, de către fiziologi au stabilit prezența absolut necesară a zincului în creșterea mucegaiurilor, dar nu li s-a dat suficientă atenție !

În secolul XX au existat două perioade majore în activitatea de cercetare a acțiunii biologice a elementelor în urme. În perioada "clasică", 1925-1956 s-a investigat necesitatea prezenței cuprului, zincului, cobaltului, magneziului și molibdenului în metabolismul animalelor. Perioada "modernă" 1957-1980, mai activă, este dominată de lucrările lui Klaus Schwarz s-au bazat pe inducerea experimentală a deficienței în elementele în urme. Aceste eforturi au avut ca rezultat atribuirea calificativului "esențial" elementelor: Se, Cr, Sn, V, F, Si, Ni, Pb, Cd, As și nu cel din urmă Li.

Adăugarea acestor elemente la cele identificate anterior ca elemente în microurme, completează la 30 numărul elementelor esențiale, lăsând în continuare lista deschisă. Aceste cercetări reprezintă noi perspective în ceea

ce privește studiul elementelor în urme și în ceea ce privește modul în care ele pot funcționa ca atomi esențiali în microurme, în procesele vieții.

I.6. Conceptul de element esențial

Epoca contemporană a cercetărilor în laborator a elementelor în urme, cu rol biologic, a început cu studii experimentale pe animale, care au urmărit inducerea anumitor deficiențe în aceste elemente. Metodele de cercetare necesitau menținerea animalelor de experiență la diete controlate. Criteriile pentru o justificare riguroasă a problemei esențialității sunt:

— Deficiența fiziologică apare atunci când elementul respectiv este îndepărtat printr-o dietă provocată;

— Deficiența fiziologică poate fi diminuată prin adăugarea în sistem a unui element specific;

— O funcție biologică specifică este asociată întotdeauna cu un element specific.

Cea mai simplă definiție pentru elementul specific este următoarea: un element specific este elementul chimic necesar pentru menținerea vieții. Absența lui poate conduce la moartea organismului sau la o severă disfuncționalitate a acestuia.

Din punct de vedere experimental, acest criteriu nu poate fi aplicat în mod riguros și din această cauză este necesar să apelăm la o altă definiție, mai cuprinzătoare, a esențialității.

Un element chimic este considerat esențial atunci când un deficit în acest element produce o diminuare a funcției biologice, iar prin adăugarea lui în sistem se produce restaurarea funcției respective sau se împiedică diminuarea acesteia. Precizăm că organismul supus experimentului poate să nu-și dezvolte complet ciclul de viață în absența elementului luat în studiu. Elementul poate avea o influență directă în organism și să fie împiedicat în metabolismul său. Efectul elementului esențial nu poate fi înlocuit de un alt element. G.C. Cotzias a definit câteva criterii suplimentare pentru definirea unui element esențial:

— elementul este prezent în țesuturile diferitelor animale în concentrații comparabile;

— eliminarea elementului din organism produce anomalii fiziologice sau structurale similare, indiferent de specie;

— introducerea sa în organism, reduce sau preîntâmpină aceste anomalii;

— aceste anomalii sunt însoţite de schimbări biochimice specifice, care pot fi preîntâmpinate sau remediate când deficienţa este rezolvată.

Elementele esenţiale în urme furnizează un exemplu clasic de cerere nutriţională, aşa cum a descris-o Bertrand încă din 1912. Un organism viu trece prin mai multe stadii, când concentraţia într-un nutrient esenţial trece de la deficienţă la exces.

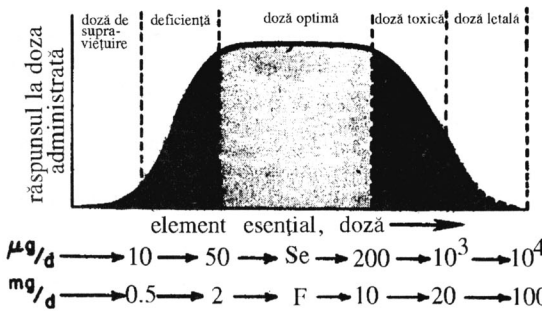


Figura I.3. Zonele dozelor de răspuns pentru un element esenţial. Sunt incluse estimările necesarului specific în micrograme pe zi pentru seleniu şi miligrame pe zi pentru fluor.

Se observă că la o deficienţă completă, organismul moare. Printr-un aport limitat, organismul supravieţuieşte, dar pot să apară o serie de dereglări metabolice. Prin adăugare de nutrient se atinge un palier, care reprezintă funcţionarea optimă a organismului. Când elementul este adăugat în exces se atinge mai întâi toxicitatea marginală, apoi toxicitatea mortală. În timp ce această curbă se poate modifica cantitativ pentru fiecare element esenţial, forma ei rămâne aceeaşi pentru toate elementele în urme. Această afirmaţie este ilustrată în figura I.3, pentru seleniu şi fluor. Pentru aceste două elemente există doar o regiune îngustă între necesarul zilnic pentru supravieţuire şi cel pentru apariţia efectelor toxice. Toxicitatea lor înaltă nu a împiedicat însă recunoaşterea acestor două elemente ca elemente esenţiale în microurme, deşi toxicitatea lor înaltă complică studiile experimentale. Ulterior, au mai fost propuse ca elemente esenţiale Pb, As, Cd, care prezintă la rândul lor o toxicitate ridicată.

I.7. Evoluţia elementelor în urme

O privire generală asupra posibilelor viitoare elemente în urme, a aparut de curând în literatura de specialitate, subliniindu-se relaţia strînsă între abundenţa în organism şi necesarul în elementul respectiv pentru organism. Abundenţa elementelor chimice în sistemele vii, reflectă concentraţiile lor relative în mări şi oceane şi într-o măsură mai mică, în scoarţa pământului.

Tabelul I.4. Abundenţa elementelor chimice în apa mărilor şi oceanelor.

Elemente	Domeniul de concentraţie, nano moli
H, O, Na, Cl, Mg, S, K, Ca, C, N	$> 10^6$
Br, B, Si, Sr, F, Li, P, Rb, I, Ba	10^6-10^2
Mo, Zn, Al, V, Fe, Ni, Ti, U, Cu, Cr, Mn, Cs,Se, Sb, Cd, Co, W	10^2-1 nM

Este probabil că formele de viaţă primară, apărute în apă şi pe ţărmurile adiacente şi-au luat elementele necesare proceselor vieţii din oceanele primitive.

Totuşi, această corelaţie între elemente şi formele de viaţă a fost micşorată de mai mulţi factori. Primul este legat de îmbogăţirea conţinutului în carbon, azot, fosfor şi sulf în organismele vii. Această afirmaţie este justificată de posibilitatea ca viaţa iniţială să fi apărut în mare, respectiv în sedimentele marine, unde concetraţia în fosfaţi şi în alte elemente minerale era mult mai mare decât în oceanele primitive. Este foarte probabil că aceste sedimente conţineau de asemenea concentraţii ridicate în alte trei elemente considerate esenţiale (As, Sb, Sn), care sunt prea diluate în oceane pentru a fi incluse în tabelul I.4.

Un al doilea factor care trebuie luat în discuţie, se referă la faptul că distribuţia elementelor în apa mărilor şi oceanelor de azi, nu reprezintă o "eră" terestră, după care atmosfera pământului nu a fost puternic oxidată. Astfel, ferul ar trebui să fie prezent în starea de oxidare mai solubilă Fe(II). Aceasta ar putea explica de ce ferul este atât de răspândit în ciuda marii sale diluţii în apă.

Al treilea factor este selecţia proceselor naturale, care conduce la alegerea câtorva elemente care au o reactivitate superioară. De exemplu,

magneziul divalent, nichelul, cobaltul divalent pot avea o funcţie similară cu a zincului divalent, aşa cum s-a ilustrat în observaţiile conform cărora aceste metale pot să înlocuiască ionii de zinc în anumite metaloenzime.

Totuşi, este clar că abundenţa elementelor nu este factorul determinant. Pentru prima dată R.J.P. Williams, explicat că solubilitatea acestor elemente este un alt factor important şi a enumerat un număr de parametri chimici, care influenţează selecţia ionilor metalici în celulele vii. Aceştia includ sarcina ionului, raza ionică, tipul atomilor donori din liganzi, geometria de coordinaţie preferenţială, stabilizarea prin împerecherea spinilor, controlul cinetic şi reactivităţile ionilor metalici în soluţie. Aceşti factori au fost discutaţi în întregime de Da Silva şi permit anumite speculaţii asupra posibilelor viitoare elemente esenţiale în urme.

I.8. Posibile elemente esenţiale în urme

Toate nemetalele (figura 4), excluzând gazele inerte, cu masa atomică mai mică decât a bromului, sunt considerate în prezent ca elemente esenţiale. Bromul este considerat ca cel mai probabil nemetal rămas a fi considerat ca un element esenţial pentru un număr limitat de specii biologice.

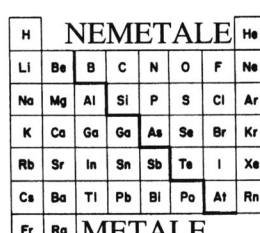


Figura I.4. Secvenţă din sistemul periodic unde se indica demarcarea dintre metale şi nemetale.

Cele mai multe din elementele uşoare rămase sunt metalele şi cele mai multe dintre elementele în urme recunoscute, pot fi privite ca metale tranziţionale sau ca o subdiviziune a grupului, aşa cum se prezintă în figura I.5.

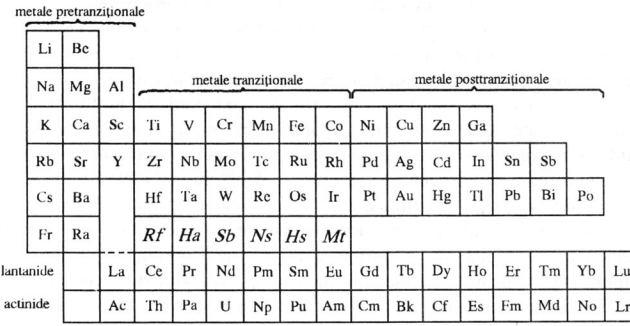


Figura I.5. Clasificarea diferitelor metale bazată pe relația lor cu metalele tranziționale.

Metalele pretranziționale includ metalele alcaline (grupa I A, sau1), metalele alcalino-pământoase (grupa II-a A, sau 2) și elementele grupei a III-a A (sau 13). Multe din aceste metale sunt esențiale: sodiu, potasiu, magneziu, litiu. Rubidiu, stronțiu și bariu sunt candidați puternici, care pot fi eventual utili din punct de vedere biologic.

Grupurile cele mai promițătoare de candidați la elemente în urme se găsesc în cadrul metalelor tranziționale și post-tranziționale. Metalele tranziționale posedă orbitali de tip d, care în mod constant sunt ocupați cu electroni, introducând o tranziție gradată în proprietățile metalice. Ele au de asemenea o capacitate specială pentru formarea unor compuși de coordinație stabili cu atomii de sulf, azot și oxigen, care la rândul lor sunt constituenți ai catenelor laterale ale proteinelor. Ferul ocupă o poziție dominantă printre metalele tranziționale, la vertebrate, fiind un metal ales de hemoglobină și alte proteine cu hem.

Cu excepția titanului, toate metalele de tip d din prima serie de tranziție (V, Cr, Mn, Fe, Co) sunt considerate esențiale. O parte din metalele post-tranziționale vecine (Ni, Cu, Zn) sunt deasemenea elemente în urme importante. Abundența multora din aceste elemente, mai ales fer, zinc și molibden, în oceanele planetare, a stimulat speculația privind originile și evoluția acestei dependențe a organismelor vii de prezența metalelor tranziționale. Elementele tranziționale rămase, nu sugerează în

plus posibilităţi importante. Titanul inhibă numeroase enzime hidrolitice, din acest motiv fiind considerat un stimulent de creştere, dar nu este evident că este bionecesar. Zirconiul este relativ netoxic şi inactiv; 5 ppm administrat şoarecilor în apa de băut, nu le-a afectat sănătatea şi longevitatea. Metalele tranziţionale rămase sunt greu absorbite de celule şi sunt relativ netoxice. Wolframul este frecvent antagonic cu molibdenul; el scade activitatea multor enzime oxidative care conţin molibden (xantină, oxidază, nitrogenază). Wolframul este biologic activ, fiind component al enzimei formiat dehidrogenaza care intră în structura mai multor bacterii.

Metalele post tranziţionale au subnivelele d ocupate când cedează electroni. Acest fapt conferă acestor metale o reactivitate mare şi o capacitate deosebită de a forma compuşi de coordinaţie. Cele mai importante elemente în urme din acest grup sunt zincul şi cuprul, care servesc drept coenzime sau grupări prostetice pentru un mare număr de enzime.

Elemente adiţionale posibile în microurme din acest grup sunt nichelul, cadmiul, staniul şi plumbul.

O serie de alte elemente post-tranziţionale (Au, Ag, Pt, Hg) au jucat un rol important în istoria civilizaţiei noastre, dar nu pot fi considerate ca elemente esenţiale.

I.9. Lantanide şi actinide

Lantanidele şi actinidele sunt două grupe de elemente grele, fiind atât de radioactive şi/sau toxice, încât este exclus să fie utile în orice parte a oricărui sistem biologic. Mai mult, actinidele se găsesc numai în cantităţi extrem de mici. Lantanidele prezintă un caracter metalic mai pronunţat. În mod normal, nici lantanidele nici actinidele nu sunt întâlnite în ţesuturile plantelor şi animalelor. Au fost detectate numai urme de lantanide (< 0,5 ppm) în oasele animalelor expuse la influenţa lantanidelor. Viitoare studii ştiinţifice riguroase vor putea proba vre-un rol esenţial în procesele biologice pentru elementele din cele două serii de tranziţionale f. Interesant este faptul că ionii lantanidelor posedă în sistemele biologice o serie de proprietăţi chimice unice, care apar numai în prezenţa ionilor de calciu.

I.10. Cum lucrează în organismele vii elementele esenţiale în microurme ?

Elementele esențiale în microurme sunt necesare pentru creșterea și supraviețuirea celulelor vii și respectiv a organismelor vii. Ele se află și funcționează normal în celule la concentrații foarte mici, în general mai mici decât 1 μM, ceea ce corespunde la 10^{-8}-10^{-9} M (50 μg/zi pentru Se).

Cum pot elementele în microurme să servească drept atomi sau molecule esențiale în celulele vii ?

Există un număr impresionant de elemente în urme, mai ales printre ionii metalelor tranziționale, care funcționează, în concentrații foarte mici, ca factori de creștere (tabelul 4).

Tabelul I.5. Cantități recomandate și dozele zilnice pentru adulți.

Element	Consum mg/zi
Fer : femei	18
bărbați	10
Zinc	15
Mangan	2,5-5,0
Fluor	1,5-4,0
Cupru	2,0-3,0
Molibden	0,15-0,5
Crom	0,05-0,2
Seleniu	0,05-0,2
Iod	0,15

Probabil că există în general un centru de legătură al metalului tranzițional, care poate răspunde individual la o varietate de ioni metalici, atâta timp cât nu sunt blocați de un alt ion metalic. Astfel, când dieta și mediul înconjurător sunt riguros controlate, centrii de legătură generali ai metalelor devin accesibili pentru noi ioni metalici, care au fost înlocuiți anterior prin procese de dietă preparativă.

Cele mai multe informații disponibile despre funcționarea elementelor în urme, se focalizează asupra rolului lor în metaloenzime. Tema dominantă a fost aceea că, elementele în urme sunt esențiale pentru că ele servesc drept grupe prostetice necesare în centrii activi sau drept coenzime pentru metaloenzime indispensabile, sau enzime metal-ion activate. În metaloenzime, un număr fix de atomi metalici specifici (în general fer, zinc, cupru, mangan, molibden, cobalt, nichel, etc.) sunt

puternic asociaţi cu o proteină specifică. Această combinaţie produce o unică funcţie catalitică. S-a estimat că 1/4 până la 1/3 din toate enzimele cunoscute, necesită un ion metalic ca participant funcţional.

I.11. Metaloenzimele

Ca exemplu principal de metaloenzime pot fi considerate proteinele care conţin ioni de fer, zinc sau cupru in situsurile (locurile) lor active. Enzimele cu zinc au fost identificate pentru toate cele 6 clase importante de enzime: oxido-reductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze şi ligaze. Ionul de zinc funcţionează ca un centru activ superacid în proteinele care sunt capabile de a iniţia hidroliza la o multitudine de legături chimice susceptibile.

Partea proteică a metaloenzimei selectează şi limitează deasemenea substraturile ce furnizează legătura chimică care va fi hidrolizată. Ionii de metal pot juca deasemenea un rol important în geometria proteinei, în poziţionarea substratului şi în formarea unui situs (loc sau centru) activ.

Metalele, ca fierul şi cuprul, au altă dimensiune fizică şi îşi schimbă brusc starea de oxidare, deci ele pot funcţiona ca purtători catalitici de electron. Aceste metale produc substraturi biologice oxidate, care apoi participă într-o multitudine de cicluri metabolice. Totuşi importanţa oxidazelor coordinate la biocationi nu poate fi supraestimată. O viziune larg acceptată, propusă de Fridovich şi colaboratorii, este faptul că este necesar un grup de enzime pentru supravieţuirea eucariotelor în condiţii de viaţă aerobică. Utilizarea oxigenului implică inevitabil producerea de compuşi toxici reactivi ai oxigenului, în particular O_2^- şi H_2O_2. Astfel, pentru a supravieţui, toate celulele aerobice trebuie să aibă, în completare, enzime intracelulare a căror activitate majoră este de a converti O_2^- şi H_2O_2 în forme netoxice de oxigen, O_2, sau H_2O aşa cum se observă în continuare:

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{\text{SOD}} H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaza}} 2H_2O + O_2$$

$$AH_2 + H_2O_2 \xrightarrow{\text{peroxidaza}} 2H_2O + A$$

Catalazele şi multe peroxidaze sunt hem-enzime tipice care necesita fier. Metaloenzima superoxiddismutaza, izolată din citoplasma eucariotică, conţine doi atomi de cupru şi doi atomi de zinc pe moleculă. Nu a fost găsită nici o substituţie activă cu un alt cation pentru cupru, dar orice ion

de metal tranziţional va substitui zincul din centrul (situsul) activ. Valle a descris modul în care cobaltul şi o varietate mare de ioni metalici, pot substitui atomii de zinc nativ în câteva enzime cu zinc (carboxipeptidaza, fosfataza alcalină) cu păstrarea unei activităţi enzimatice apreciabile.

Tabel I.6. Proprietăţile metalelor esenţiale în urme

Metal în urme	Deficienţe	Funcţii specifice
Mangan	- deficienţe de creştere;	Metabolismul carbohidraţilor. Superoxiddismutaza, piruvatcarboxilaza,etc.
Molibden	- deficienţe de creştere;	Oxidaze: aldehide, sulfuri, xantine. Molibdopterin.
Cobalt	- anemie; - accentuarea retardării;	Constituent al vitaminei B_{12}
Crom	- rezistenţă insulinică;	Favorizarea acţiunii insulinei pe carbohidraţi şi lipide; activ ca un complex, crom bioorganic.
Vanadiu	- deficienţe de creştere;	Controlează pompa de sodiu; inhibarea ATP-azei, p-transferazei.
Nichel	- deficienţe de creştere; - reduce utilizarea N; - reduce metabolizarea Fe.	Constituent al ureazei; reducerea hemopoezei.
Cadmiu	- deficienţe de creştere; - reduce reproducerea.	Stimulează factorii de alungire în ribozomi.
Staniu	- deficienţe de creştere.	(Interacţiuni cu riboflavina)
Plumb	- deficienţe de creştere; - anemie.	(Multe efecte enzimatice)
Litiu	- deficienţe de creştere; - reduce reproducţia.	Controlează pompa de sodiu

Dintre cele zece metale care se găsesc în urme, prezentate în tabelul I.6, numai patru (mangan, molibden, cobalt şi nichel) au fost identificate în mod cert ca părţi componente ale metaloenzimelor. Manganul este prezent în câteva metaloenzime importante: superoxiddismutaza (mitocondrială), arginaza, piruvatcarboxilaza şi glicoziltransferaza. Manganul pare să fie implicat direct în mecanismul enzimatic al metabolismului carbohidraţilor

cu posibile legături în metablismul lipidic. În toate molibdometaloenzimele, cu excepția nitrogenazei, metalul există ca un Mo cofactor, un complex metalic cu o moleculă organică numită molibdopterină prezentată în figura I.6.

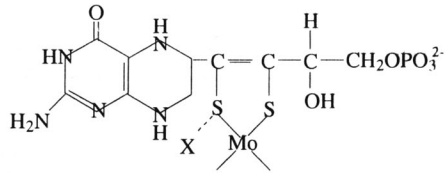


Figura I.6. Structura propusă pentru Mo cofactor, molibdopterină.

Molibdenul poate fi coordinat la doi liganzi oxo sau la un ligand oxo și o grupare sulfură terminală. În nitrogenază, metalul este prezent într-un cluster unic care conține fer, molibden și S^{2-}. În plante și microorganisme, se știe că nichelul funcționează în câteva metaloenzime-ureaze, hidrogenaze și monoxid de carbon dehidrogenază. Rolul cobaltului, în ciuda complexității sale, este cel mai bine elucidat dintre toate metalele esențiale care se găsesc în urme. Atât vitamina B_{12} cât și coenzima B_{12} au ioni de cobalt complexați în pozițiile lor ecuatoriale, de patru atomi de azot, care aparțin unui ligand macrociclic numit corină, după cum se vede în figura I.7.

Corina este legată covalent prin intermediul lanțului amidă-fosfat-riboză la un 5,6-dimetilbenzimidazol, cu coordinare la ionul de cobalt. Aceste componente servesc drept cofactori în diverse reacții enzimatice în care un atom de hidrogen este interschimbat cu un atom de carbon substituit adiacent. Un exemplu cunoscut pentru enzima cu cobalt este metil-malonil-CoA mutaza, care este o mutază ce catalizează rearanjarea intramoleculară la succinil CoA.

Astfel, metaloenzimele au furnizat cel mai bun model pentru a determina cum operează ionii de metal în urme. Datele pe care se bazează acest model, pentru cele șase metale în urme care au mai rămas, crom, vanadiu, cadmiu, staniu, plumb și litiu, lipsesc. Cromul funcționează "in vivo" ca un complex organic al cromului (peptidic ?). Rolul său biologic este de a susține activitatea insulinei. Alături de crom, acest complex organic poate conține acid nicotinic și glutation sau constituenții săi.

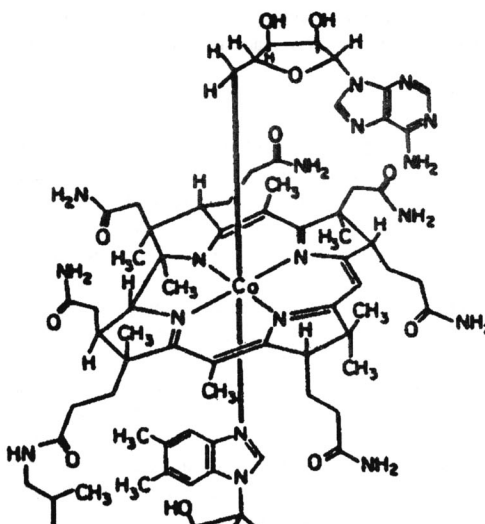


Figura I.7. Structura chimică a coenzimei B_{12} cu indicarea complexării Co(II) în corină.

Compuşii vanadiului inhibă numeroase enzime, în particular ATP-aze şi fosfo-transferaze. Acest lucru a sugerat un rol pentru ionul vanadat în controlul pompei de sodiu. Vanadiul este folosit de asemenea ca biocatalizator pentru oxidarea substraturilor implicate în metabolismul colesterolului. Cu excepţia inducţiei metalotioneinei, cele mai multe efecte biologice ale cadmiului au fost cele de inhibiţie. Ameliorările deficienţelor în plumb, duce la corectarea sau prevenirea modificărilor în metabolismul ferului şi hematologie. Datele asupra posibilelor acţiuni ale staniului şi litiului lipsesc. Deocamdată nu s-au găsit explicaţii pentru acţiunea acestor ultime 6 elemente în urme şi nu există nici o garanţie că vor fi

găsiți reactanți peptidici sau proteici specifici. Provocarea pentru chimiștii bioanorganicieni pentru rezolvarea acestor probleme este limpede.

I.12. Nemetale

Așa cum s-a arătat în tabelul I.7., nemetalele esențiale cuprind un grup mult mai eterogen decât metalele tranziționale, a căror proprietăți au fost aproape toate lămurite. Doi halogeni esențiali prezintă o specificitate înaltă și foarte diferită. Fluorurile au un efect remarcabil împotriva cariilor dentare. Acest lucru poate fi legat de posibilitatea ionului fluorură de a înlocui gruparea HO^-, în felul acesta stabilizând matricea structurală a oaselor și dinților. Fluorura poate inhiba puternic de asemenea enzimele cheie: enolaze, pirofosfataze. Nu se poate afirma cu certitudine că o enzimă specifică sau alte sisteme pot indica acțiunile biologice ale ionului fluorură.

Una din surprizele majore dintre nemetale o furnizează seleniul. În ciuda marii sale toxicități (0,2 mg/zi), seleniul a fost nominalizat ca făcând parte din câteva enzime implicate în reacții esențiale de oxido-reducere. O enzimă, glutation peroxidaza (GSH), joacă un rol important în protecția celulelor roșii din sânge împotriva efectelor peroxidului de hidrogen (H_2O_2), care este generat în interiorul celulei conform schemei de mai jos:

Acesta este un prim exemplu de enzimă care se bazează pe un ion de nemetal în urme, pentru activitatea sa biologică.

Se cunoaște încă destul de puțin despre cele trei nemetale rămase Si, As și B, care accentuează probabilitatea ca mecanismele lor de acțiune la fel ca și metalele discutate anterior, să fie independente de cele șase nemetale. Siliciul are un rol structural de legătură în țesuturi și în celulele osteogenice. Nu s-a confirmat deocamdată o funcție biologică specifică pentru arsen. Ultimele cercetări sugerează că arsenul afectează arginina, fosfolipidele membranare și metabolismul zincului. Este mai puțin toxic decât seleniul și un element în urme cu un rol stabilit. Primele cercetări despre bor, se referă la rolul său esențial pentru plante, incluzînd funcțiile membranelor și biosinteza acizilor nucleici. Rolul său în aceste sisteme ale

plantelor, poate fi extrapolat uşor la sistemele similare din organismele animale.

Tabel I.7. Proprietăţile nemetalelor esenţiale în urme

Nemetale în urme	Semne de deficienţă	Funcţii specifice
Fluor	deficienţe de creştere	structura dinţilor şi a oaselor; inlocuieşte OH; inhibă enolazele si pirofosfatazele
Iod	guşă; funcţii tiroidiene reduse.	constituent al hormonilor tiroidieni: T3 si T4
Seleniu	degenerarea hemolitică a muşchilor şi a pancreasului	constituent al glutation peroxidazei si al altor enzime;protecţie împotriva oxidării eritrocitelor
Siliciu	deficienţe de creştere; deformări ale oaselor si ale matricilor	rol structural in ţesutul conjunctiv şi al celulelor osteogenice
Arsen	tulburări de creştere; reproducere; funcţii ale inimii	arginina crescută -> urea + ornitina metabolismul compuşilor de metil
Bor	creşteri ale angiospermelor; tulburări ale fixării nitrogenului	controlul funcţiilor membranei; biosinteza acidului nucleic; biosinteza ligninei

I.13. Iodul şi hormonii tiroidieni

Pentru a concluziona perspectiva asupra nemetalelor ca bioelemente, vom evidenţia relaţia unică între iod şi hormonii tiroidieni. Probabil că nici o altă idee nu este cunoscută ca o legendă în istoria medicală. Iodul a fost stabilit ferm ca primul ca un constituent indispensabil al glandei tiroide de către Baumann în 1896. De atunci

prezența sa a dominat considerația structurii și funcționării hormonului tiroidian, cu o evidențiere specială a proprietăților iodului ca un captator de electroni. S-a presupus că pozițiile 3, 5 și 3' pe tironină au fost ocupate de halogeni, în particular iod și brom, pentru a înțelege necesitățile minime electronice și structurale pentru activitatea hormonilor tiroidieni. Ulterior Jorgensen, Block și colaboratorii lor, au sintetizat câțiva derivați fără halogeni care au avut o activitate tiromimetică semnificativă, în special 3,5 dimetil-3'-izopropiltironină (figura I.8), care au avut 20-25% din activitatea tiroxinei.

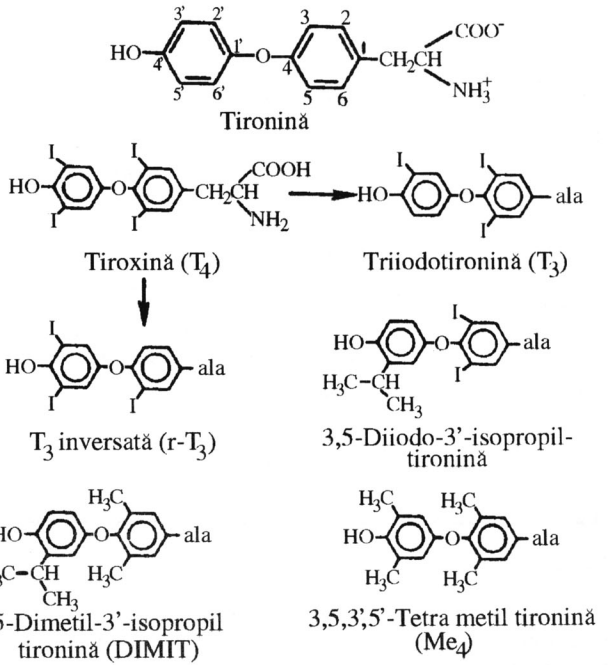


Figura I.8. Structura tiroxinei, triiodotironinei și a unor tironine substituite.

Nu există o necesitate absolută pentru iod sau alt halogen, pentru activitatea hormonilor tiroidieni la amfibii şi mamifere. Rolul primar al iodului, este de a asigura restricţiile sterice (I.9) corespunzătoare pe substituenţii 3, 5, 3' de pe o matrice tridimensională semirigidă (tironina) şi de a facilita biosinteza a tri- şi tetraiodtironinei (T_3, T_4) în glanda tiroidă.

Care este atunci relaţia directă între iod şi hormonii tiroidieni? Este găsită în biosinteza şi metabolismul lui T_4 şi T_3. După apariţia vieţuitoarelor în apa de mare, acestea au avut acces rapid la iod şi şi-au putut dezvolta un mecanism care implică o reţinere prin împiedicare sterică a acestuia.

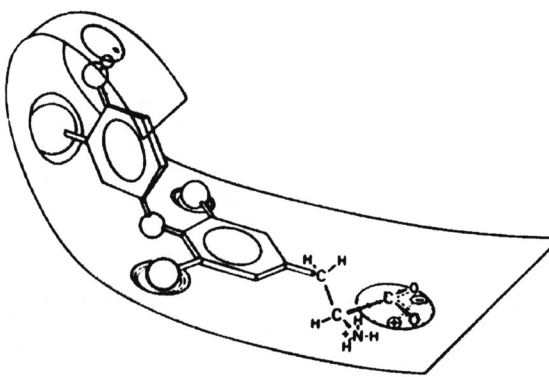


Figura I.9 Efecte sterice în tironinele substituite.

Prezenţa iodului alături de sistemele H_2O_2-peroxidază, permite un mecanism convenabil pentru introducerea iodului în poziţia orto a nucleului fenolic al tirosinei, înăuntru sau înafara lanţului proteinelor, pentru a forma mono- şi diiodotirozină.

Introducerea grupărilor de dimensiuni similare, metil sau izopropil, în poziţia orto faţă de gruparea hidroxil a fenolului, este extrem de rară în metabolismul vertebratelor. În condiţii oxidative, aceşti compuşi ai iodului, cu un singur ciclu, au fost preferaţi pentru reacţiile de cuplare pentru a forma iodotironina, în special T_4 (figura I.10). Multe proteaze au fost disponibile pentru eliberarea iodotironinei din legăturile peptidice în

ser. Proteinele serice legate specific, legătura T_4-globulină şi prealbumina, s-au dezvoltat pentru a asigura un transport protector al aminoacizilor iodurați.

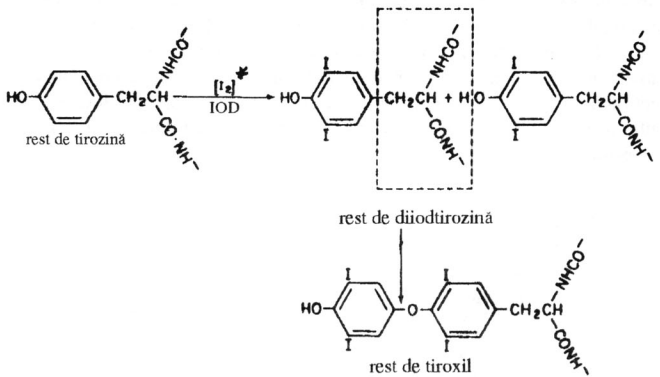


Figura I.10 Formarea restului tiroxil prin iodurarea şi condensarea a două resturi de tirozil.

Abilitatea de a capta preferențial iod, permite reutilizarea iodului după deiodizarea metabolică, contribuind suplimentar la economia sintezei hormonului tiroidian. Toate aceste circumstanțe s-au combinat pentru a favoriza biosinteza T_3 şi T_4 cu funcția lor unică în vertebrate.

I.14. Antagonismul elementelor esențiale în urme

Obiectivele cercetării asupra elementelor în urme, nu vor putea fi atinse complet chiar şi după ce toate elementele vor fi studiate cu atenție, privind necesitatea prezenței lor în organism. Va fi necesar să fie investigat impactul dintre un element esențial în urme particular cu alte elemente esențiale în urme. Numeroase efecte antagoniste şi sinergice au fost deja observate. De exemplu, absorbția zincului este perturbată de ferul în starea de oxidare (II). Cantități mari de zinc induc o deficiență relativă în cupru, probabil prin interferență cu absorbția de cupru. Molibdenul şi sulful antagonizează cuprul, printr-o interacțiune ternară implicând formarea de

cupru tiomolibdat, care cauzează deasemenea o reducere a cantității de cupru. Wolframul este antagonic cu molibdenul în câteva enzime oxidative care necesită molibden (xantin oxidaza). Câteva exemple de antagonisme între elemente, sunt prezentate în figura I.11.

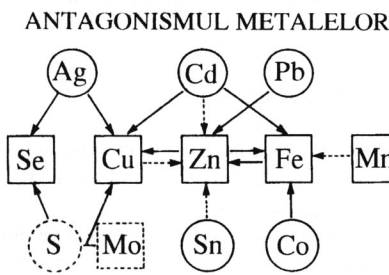


Figura I.11. Antagonismele în biodisponibilitatea metalelor și nemetalelor. Fiecare săgeată îngroșată indică un antagonism puternic între cele două elemente. Săgețile punctate indică un antagonism mai slab.

Trebuie să ne așteptăm la o competiție între cele patru halogenuri, în aportul lor la glanda tiroidă a vertebratelor.

Interacțiunile elementului în urme nu sunt limitate la competiție și antagonism. Un exemplu de interacțiune pozitivă, este rolul cuprului (în formarea plasmei proteinei de cupru, ceruloplasmina) în promovarea mobilizării ferului în biosinteza hemoglobinei.

Dintre cele 109 elemente cunoscute, 30 de elemente sunt considerate ca fiind esențiale pentru supraviețuirea organismelor vii. 19 din 30 sunt elemente în urme, din care 12 sunt metale tranziționale. S-ar putea să mai existe încă multe elemente esențiale de identificat. Se poate considera că au activitate biologică, aproape jumătate dintre elementele esențiale în urme care funcționează în metaloenzime, incluzând fer, zinc, cupru, mangan, molibden, cobalt, nichel și seleniu.

Oricum nu putem explica cu siguranță acțiunea a numeroase metale esențiale și a elementelor în urme nemetale, incluzând în această categorie vanadiu, crom, cadmiu, plumb, staniu, litiu, fluor, siliciu, arsen și bor. Grupul acestor ultime elemente, constituie o nouă provocare pentru chimiștii bioanorganicieni, biochimiști și nutriționiști.

PRINCIPALII LIGANZI BIOLOGICI

În procesele biologice anumiți anioni sau unele molecule mici se leagă de ionii metalici prezenți în sistem. Același lucru se întâmplă și cu grupările mai complexe.

II.1. Molecule sau anioni simpli

În organismele vii unele molecule simple cum ar fi H_2O, N_2, O_2, sau anioni O^{2-} (oxid), HO^- (hidroxil), $O_2^{\bullet-}$ (superoxid), O_2^{2-} (peroxid), S^{2-} (sulfură) se pot lega de biocationi.

De exemplu un ion oxid se leagă simultan de doi ioni de fer în hemetritrină (figura II.1), care este o proteină ce servește la fixarea reversibilă și la transportul moleculei de dioxigen în anumiți viermi marini, care sunt lipsiți de hemoglobină. Despre o astfel de grupare care se leagă de doi ioni metalici se spune că "puntează" cei doi ioni .

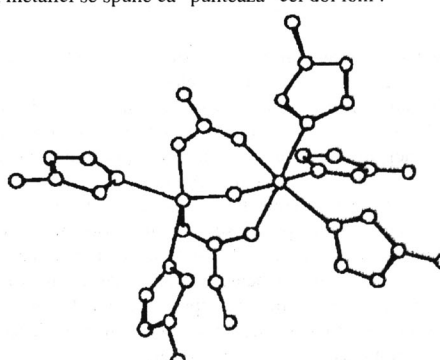


Figura II.1. Structura centrului activ al hemeritrinei. Acest centru conține doi atomi de fer. Unul este legat de trei grupări histidinice, două grupări carboxilat și un ion oxid. Celălalt atom este legat de două grupări histidinice și la fel ca atomul precedent de doi ioni carboxilat și de un ion oxid. Dioxigenul se leagă reversibil de atomul de fer pentacoordinat.

Trebuie remarcat faptul că în hemeritrină în afară de anionul oxid formează punţi şi două grupări carboxilat.

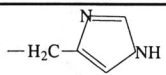
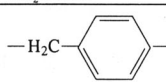
II.2. Catenele laterale ale aminoacizilor

Când participă la o structură proteică, anumiţi aminoacizi, pot juca rol de liganzi prin gruparea laterală R:

$$NH_2\text{-}CHR\text{-}COOH$$

Este vorba mai ales de histidină, cisteină, metionină, acid glutamic, acid aspartic, tirozină, serină şi treonină. grupările laterale ale acestor aminoacizi ce se leagă de biocationi sunt prezentate în tabelul II.1.

Tabelul II.1. Grupările laterale ale unor aminoacizi ce intră în structura unor proteine.

Aminoacid	Radicalul R
Histidina (His)	
Cisteina (Cys)	$-CH_2SH$
Metionina (Met)	$-CH_2CH_2SCH_3$
Acid glutamic (Glu)	$-CH_2CH_2COOH$
Acid aspartic (Asp)	$-CH_2COOH$
Tirozina (Tyr)	
Serina (Ser)	$-CH_2OH$
Treonina (Tre)	$-CH(OH)CH_3$

În centrul activ al hemeritrinei (figura II.1.) se observă că lanţurile laterale ale moleculelor de histidină se leagă de atomii de fer printr-un atom de azot; cele două grupări carboxilat, care leagă în punte doi atomi metalici provin una de la o moleculă de acid aspartic şi alta de la un acid glutamic.

Plastocianina este un exemplu în care un ion de cupru (I sau II), este legat la lanţurile laterale ale celor două grupări de histidină, de o cisteină şi de o metionină (figura II.2.).

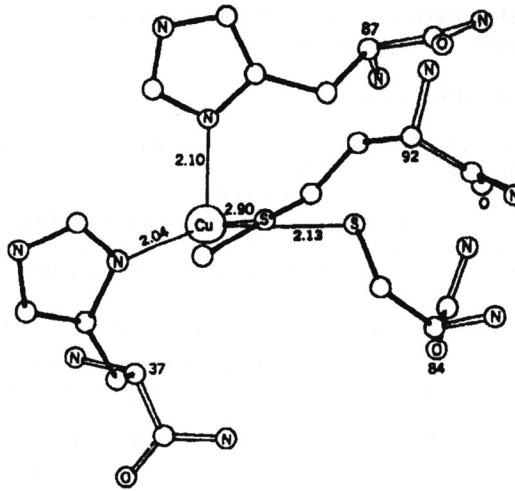
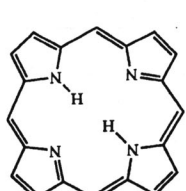


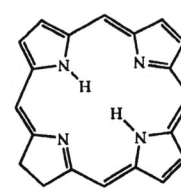
Figura II.2. Centrul activ al plastocianinei format dintr-un ion de cupru legat de două histidine, o cisteină şi o metionină.

II.3. Liganzi sintetizaţi special pentru a "prinde" ionii metalici

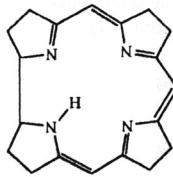
Natura a selecţionat molecule a căror funcţiune specifică constă în a "prinde" ionii metalici. Este cazul macrociclurilor de tipul porfirinelor:



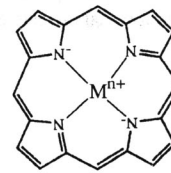
porfirină



clorină
(2,3-dihidroxi porfirină)



corină



complex metaloporfirinic

Aceste molecule după pierderea a doi protoni formează un dianion care este un ligand puternic pentru ionii metalici în general şi pentru unii biocationi în special. Un ion de fer legat de un astfel de macrociclu este prezent în centrul hemoglobinei (figura II.3.). Ansamblul format din ionul de fier şi de porfirină (denumit hem) este menţinut în proteină de o legătura între ionul de fer şi o grupare de histidină. Dioxigenul se fixează reversibil în poziţia trans faţă de acestă grupare de histidină, ceea ce permite hemoglobinei să transporte dioxigenul de la celulele bogate în O_2 spre celulele sărace.

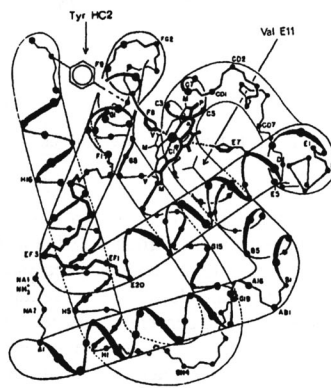


Figura II.3. Structura uneia din cele patru unităţi de hemoglobină. Fiecare punct reprezintă un atom de carbon Cα al unui aminoacid constituent al proteinei. Se observă centrul activ constituit de hem. O grupare histidină (F8) se leagă şi de un atom de fer din hem.

Un alt exemplu spectaculos de moleculă selecţionată de natură pentru a lega un ion metalic este enterobactina (figura II.4)

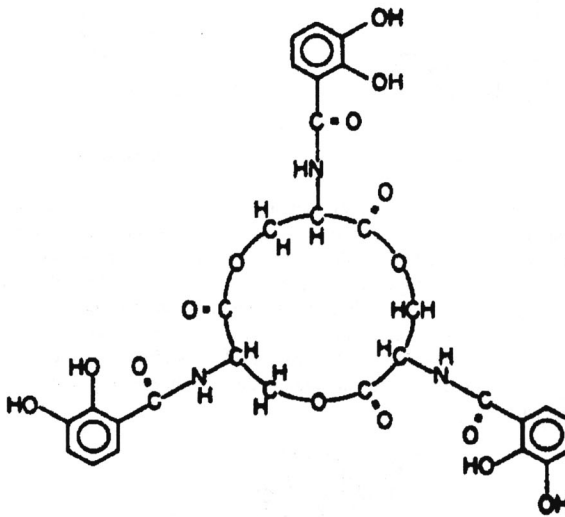


Figura II.4. Structura enterobactinei.

Acestă moleculă prezintă trei radicali de catechină care se pot asocia foarte puternic la un ion Fe(III) pentru a forma un centru octaedric FeO_6. Stabilitatea sistemului astfel format este foarte mare (constanta de asociere $K > 10^{45}$.) Această enterobactină este secretată de bacterii pentru "a ne fura " atomii de fier de care ele au nevoie. De fapt cea mai mare parte a bacteriilor nu cresc decât dacă concentraţia în fer liber este de cel puţin 10^{-8} M . Ţesuturile umane au o concentraţie în fer liber inferioară lui 10^{-18} M. Bacteriile care utilizează enterobactina au un dispozitiv pentru a elibera ferul şi a-l putea utiliza: este vorba de o proteină capabilă să reducă compusul de coordinaţie Fe(III)-enterobactină la Fe(II)-enterobactină. Acest ultim compus este mult mai puţin stabil decât complexul cu Fe(III).

CARACTERISTICILE GENERALE ALE COMPUŞILOR COORDINATIVI AI BIOMETALELOR CU BIOLIGANZII

Multe biometale formează compuşi coordinativi cu bioliganzii. Compuşii coordinativi se caracterizează în primul rând prin numărul de coordinare, adică numărul atomilor care formează sfera de coordinare a ionului central, deci a biocationului (cationul care formează compusul coordinativ).

Ionul central şi liganzii formează sfera internă a compusului coordinativ. Atomii donori ai ligandului se situează în spaţiu, într-o ordine strict determinată, formând o figură geometrică (tetraedru, octaedru, bipiramidă trigonală etc).

Cele mai frecvente numere de coordinare şi geometrii caracteristice ale compuşilor coordinativi ai biocationilor sunt prezentate în tabelul III.1.

Numerele de coordinare şi geometria compuşilor coordinativi indicaţi se realizează în condiţii specifice de sinteză. Destul de des se formează compuşi de coordinaţie cu liganzi micşti. Compuşii de coordinaţie de acest tip joacă un rol destul de mare în transportul ionilor metalici în organism.

Chiar unul şi acelaşi ligand care conţine mai mulţi atomi donori poate participa la realizarea internă destul de complexă şi la o geometrie „neobişnuită" a sferei de coordinare a atomului central.

Liganzii simpli, cum ar fi ioni sau molecule mici (ionii halogenură,moleculele de apă, amoniac, amine etc) conţin numai un atom donor şi sunt monodentate.

Liganzii poliatomici se pot coordina în diferite moduri. Astfel ionii NO_3^-, CO_3^{2-} sau $C_2O_4^{2-}$ pot să se coordineze monodentat sau bidentat (printr-un atom de oxigen sau prin doi astfel de atomi).

Se cunosc liganzi polidentaţi care se coordinează prin mai mulţi atomi donori. De exemplu ionul etilendiaminotetraacetic $C_4H_4\left[N(CH_2COO)_2\right]_2^{4-}$ poate să se coordineze prin şase atomi (patru atomi de oxigen şi doi de azot).

Formarea ciclurilor în compuşii de coordinaţie cu liganzi polidentaţi (efectul de chelatare) conduce la stabilizarea acestor compuşi în

comparație cu acei compuși de coordinație în care există aceiași atomi donori, dar provenind de la liganzi care nu dau cicluri.

Tabelul III.1. Numerele de coordinație și geometriile unor biocationi

Biocationul	Număr de coordinare și geometrie	Biocationul	Număr de coordinare și geometrie
Na^{+}	4 - tetraedru 6 - octaedru	Fe^{+2}	4 - tetraedru 6 - octaedru 5, 7 - geometrie complexă
K^{+}	6 - octaedru 8 - aproximativ cubică	Fe^{+3}	4 - tetraedru 6 - octaedru 5,7-geometrie complexă
Mg^{+2}	6 - octaedru	Co^{+2}	4 - tetraedru, pătratic 5 -bipiramidă trigonala 6 - octaedru
Ca^{+2}	6 - octaedru 8 - cubică, deformată	Ni^{+2}	4 - tetraedru, pătratic 5 - piramidă pătratică, bipiramidă trigonală 6 - octaedru, prismă
Zn^{+2}	4 - tetraedru 5 - piramidă patratică, bipiramidă trigonală 6 - octaedru	Cu^{+2}	4 - pătratic, tetraedru deformat 5 - piramidă pătratică, bipiramidă tigonală 6 - bipiramidă tetragonală
Mn^{+2}	4 - tetraedru, pătratic 6 - octaedru 5, 7 - geometrie complexă	Mo^{+5}	5 - piramidă pătratică, bipiramidă trigonală 6 - octaedru 8 - dodecaedru

Această stabilitate deosebită poate fi ilustrată cu ajutorul mai multor exemple. Probabil cel mai cunoscut exemplu este stabilizarea compușilor de coordinație cu poliamine, în comparație cu stabilitatea compușilor de coordinație cu monoamine ca liganzi. Astfel, constantele de stabilitate pentru formarea compușilor de coordinație cu Ni(II) care conține doi atomi donori de azot, diferă destul de mult unul de altul :

$Ni^{2+}_{aq} + en \rightleftharpoons [Ni(en)]^{2+}_{aq}$ $\log K = 7,5$

(en = $H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH_2$)

$Ni^{2+}_{aq} + 2\ NH_3 \rightleftharpoons [Ni(NH_3)_2]^{2+}_{aq}$ $\log K = 5,0$

Combinarea acestor reacţii care caracterizează „efectul de chelatare" dă în final ecuaţia chimică:

$[Ni(NH_3)_2]^{2+}_{aq} + en \rightleftharpoons [Ni(en)]^{2+}_{aq} + 2\ NH_3 \log K = 2,5$

$\Delta H^0 = -7,94$ kJ/ mol ; $\Delta S^0 = -25,91$ J/ mol.K

Aşadar, efectul de chelatare include pe lângă efectul entropic şi efectul entalpic . De obicei, efectul energetic în timpul chelatizării este legat de repulsia reciprocă a atomilor donori în timpul formării complexului din liganzi simpli de tip NH_3 şi de absenţa repulsiei în timpul formării complexului cu liganzii chelatanţi (repulsia există deja în ligandul liber). Este posibil ca efectul de chelatare să fie explicat şi prin solvatarea mai redusă a ligandului chelatant comparativ cu solvatarea a doi liganzi simpli.

Datele prezentate confirmă regula „ciclurilor" stabilită de mult de Ciugaev : mai stabile sunt combinaţiile complexe cu ciclurile de cinci atomi (compuşii de coordinaţie cu oxalat sunt mai stabili decât cei cu malonat ; compuşii de coordinaţie cu α-aminoacizi sunt mai stabili decât cei cu β-aminoacizi). Aşa cum rezultă din acest tabel un rol deosebit îl joacă efectele entalpice şi entropice, cu toate că, contribuţia efectului entalpic (ΔH) este de obicei mai importantă.

Trebuie de menţionat că în majoritatea biocompuşilor de coordinaţie se formează cel mai adesea cicluri de cinci sau şase membri (compuşi de coordinaţie cu α-aminoacizi, cu unele vitamine, acizi dicarboxilici etc).

O mare influenţă asupra stabilităţii compuşilor de coordinaţie o are şi numărul ciclurilor chelate; cu creşterea numărului lor, stabilitatea compuşilor de coordinaţie creşte. Este necesar să menţionăm că posibilitatea formării acestor cicluri chelate este mai mare în cazul bioliganzilor macromoleculari (proteine şi acizi nucleici).

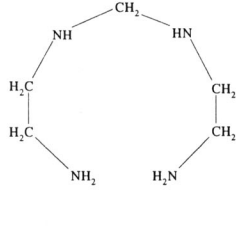
O serie de date termodinamice care ilustrează rolul efectului de chelatare sunt prezentate în tabelul III.2.

În ultimii ani, a fost observat un efect macrociclic destul de interesant şi important, care este demonstrat cel mai convingător în cazul

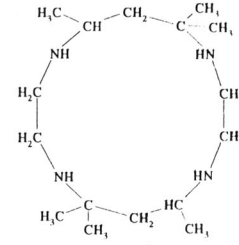
compușilor de coordinație ai cuprului Cu^{2+} cu liganzii tetraaminici (figura III.1).

Tabel III.2. Caracteristicile termodinamice ale unor reacțiile de formare a compușilor coordinativi de tipul $Ni^{+2}+L^{n-} \rightarrow NiL^{2-n}$

Reacția	log K	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.grad)	Numărul ciclurilor
$Ni^{+2} + (C_2O_4)^{-2}$	5,2	0,63	101,16	1
$Ni^{+2} + (CH_2C_2O_4)^{-2}$	4,1	7,18	104,50	1
$Ni^{+2} + H_2N(CH_2)_2COO^-$	4,7	-15,92	42,63	1
$Ni^{+2} + H_2N\text{-}CH_2COO^-$	6,2	-17,30	60,19	1
$Ni^{+2} + (HN(CH_2COO)_2)^{-2}$	8,0	-21,10	83,60	2
$Ni^{+2} + (N(CH_2COO)_3)^{-3}$	11,3	-10,57	183,92	3
$Ni^{+2} + H_2N(CH_2)_2NH_2$	7,7	-37,82	16,72	1
$Ni^{+2} + (H_2N(CH_2)_2)_2NH$	10,5	-49,53	35,53	2
Ni^{+2} + $H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}CH_2$ $H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}NH\text{-}CH_2$	13,7	-58,52	66,88	3



L'



L''

Figura III.1. Stabilitatea compușilor de coordinație ai Cu^{2+} cu liganzi tetraaminici, aciclici și ciclici.

$Cu^{2+} + L' \rightarrow CuL' + 2H^+$ $\log K = 23,9$

$Cu^{2+} + L'' \rightarrow CuL'' + 2H^+$ $\log K = 28,0$

Cum se observă, apariția ciclului chelat cu aceiași atomi donori, conduce la mărirea stabilității complexului cu cupru.

Mărirea stabilității complexului în acest mod este legată probabil în primul rând de efectul entropic (deshidratare mai avansată la introducerea ionului metalic în macrociclu, modificări conformaționale mult mai reduse în timpul formării complexului macrociclic etc).

Este cunoscut faptul că viteza reacției de scoaterea a ionului metalic din macrociclu este foarte mică. Modificarea raportului constantelor de echilibru duce la mărirea constantei de stabilitate a compușilor de coordinație macrociclici, comparativ cu constantele compușilor de coordinație obișnuiți. Pentru caracterizarea geometrică a compușilor de coordinație cu liganzi macrociclici, este necesar să se introducă noțiunea de „gol" sau „fereastră" pentru liganzi macrociclici de tip plan. Dimensiunile golului pot fi determinate în moduri diferite. De exemplu, pentru construirea modelului de ligand, pot fi utilizate modelele Steward și apoi determinate dimensiunile golului format. În prezent această modelare se realizează pe calculator cu prin intermediul unor programe specializate cum ar fi HyperChem, ChemPlus, CSC Chem3D, Alchemy etc. Este evident că pentru caracterizarea golului sunt îndeplinite nu numai caracteristicile geometrice (coordonatele spațiale ale atomilor donori care formează golul) dar și caracteristicile electronice ale atomilor donori (atomii „tari" de oxigen, atomii „moi" de sulf și atomii „intermediari" de azot). Atomii care intră în macrociclu în funcție de poziția lor în spațiu reacționează în mod diferit cu atomul (sau ionul) care se află în „gol". Din această cauză liganzii macrociclici au o selectivitate diferită față de anumiți ioni.

Noțiunea de „gol" este foarte importantă pentru chimia bioanorganică deoarece majoritatea biocompușilor de coordinație se formează prin introducerea ionului metalic în „golul" proteinei, nucleotidei, acidului nucleic etc. Unii liganzi pot să se coordineze prin atomi diferiți, numindu-se ambidentați. În calitate de ligand ambidentat funcționează ligandul NCS^-. Acest ion poate să se coordineze fie prin atomul de N, fie prin atomul de S.

O caracteristică termodinamică importantă a compusului coordinativ este constanta de stabilitate, adică constanta de echilibru a reacției (pentru simplificare s-au omis sarcinile reactanților și produșilor de reacție) :

$$M + nL \rightleftharpoons ML_n \qquad \text{(III.1)}$$

$$\frac{[ML_n]}{[M][L]} = \beta_n \qquad \text{(III.2)}$$

Pe lângă constanta globală de stabilitate se determină şi constantele de stabilitate parţiale :

$$K_n = \frac{[ML_n]}{[ML_{n-1}][L]} \qquad (III.3)$$

Prima dintre constantele parţiale de stabilitate K_1 este constanta de echilibru a reacţiei :

$$M + L \rightleftharpoons ML \qquad (III.4)$$

În acest caz

$$K_1 = \beta_1 \qquad (III.5)$$

Cea mai frecventă metodă pentru determinarea constantelor de stabilitate a compuşilor de coordinaţie este titrarea potenţiometrică. În acest caz se efectuează titrarea potenţiometrică în absenţa şi respectiv în prezenţa ionului metalic care formează compuşi coordinativi. În acest caz se observă că există o concurenţă între proton (H^+) şi ionul metalic M^{n+}pentru „capturarea" ligandului. În timpul titrării potenţiometrice au loc cel puţin două procese :

$$H^+ + H_pL \rightleftharpoons H_{p+1}L \qquad (III.6)$$

$$H^+ + MLH_q \rightleftharpoons M^+LH_{q+1} \qquad (III.7)$$

(în cazurile cele mai simple p = 0 şi q = 0).

Cel mai frecvent, constantele de stabilitate se pot calcula utilizând una dintre următoarele funcţii :

- funcţia de formare Bierum

$$\bar{n} = \frac{c_L^0 - [L]}{c_M^0} \qquad (III.8)$$

- din funcţia de complexare

$$\Phi = \frac{c_M^0}{[M]} \qquad (III.9)$$

unde c_L^0 şi c_M^0 sunt concentraţiile globale ale ligandului şi ionului metalic, iar M şi L concentraţiile lor la echilibru.

Aceste funcţii sunt legate de constantele de stabilitate prin relaţiile:

$$\bar{n} = \frac{\beta_1[L] + 2\beta_2[L]^2 + 3\beta_3[L]^3 + ...}{1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2 + \beta_3[L]^3 + ...} \qquad (III.10)$$

$$\Phi = 1 + \beta_1[L] + \beta_2[L]^2 + \beta_3[L]^3 + ... \qquad (III.11)$$

În unele cazuri este necesar să se cunoască concentraţia ligandului la echilibru. În primul caz aceasta este necesară pentru calcularea funcţiei

de formare şi a constantelor de stabilitate (β_1, β_2,...,β_n). În al doilea caz concentraţia ligandului la echilibru intră în calculul constantelor de stabilitate. Dacă avem un surplus mare de ligand ($c_L^0 >> c_M^0$) concentraţia lui globală poate fi egalată cu concentraţia la echilibru.

În literatură se pot găsi destul de multe date referitoare la constantele de stabilitate pentru compuşii de coordinaţie ai biocationilor cu α-aminoacizii (tabelul III.3). În toate cazurile stabilitatea compuşilor de coordinaţie variază în ordinea:

$Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Cd^{2+} < Co^{2+} < Zn^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} < Fe^{3+}$

Această serie este atât de stabilă, că poate fi utilizată pentru corelarea şi controlul datelor experimentale.

Majoritatea datelor experimentale pot fi prezentate sub formă de drepte descrise de expresii de tipul :

$$pK_{ML'} = a + bpK_{ML} \qquad \text{(III.12)}$$

unde $pK_{ML'}$ şi pK_{ML} sunt logaritmii constantelor de stabilitate a compuşilor de coordinaţie ai biometalului dat cu liganzii L' şi L iar a şi b sunt nişte constante.

În abscisă se trec valorile pK_{ML} pentru acei compuşi de coordinaţie pentru care constantele de stabilitate sunt determinate mai precis, iar liganzii L studiaţi posedă o structură cât mai simplă. Exemplu, compusul de coordinaţie cu glicina.

Ecuaţia de corelare III.12 este analoagă cu expresiile utilizate în chimia teoretică organică de către Hammet şi Taft. Această corelaţie strictă este considerată posibilă din cauză că dimensiunile ionilor studiaţi sunt aproximativ egale, cele ale atomilor donori (O şi N) sunt tot egale şi deci modificarea stabilităţii compuşilor de coordinaţie, în sensul prezentat mai sus este determinată complet de integralele coulombiene şi de cele de suprapunere, care se modifică în acelaşi mod în această serie. Totuşi se poate presupune că odată cu modificarea naturii atomului donor corelaţia de acest tip poate să nu aibă loc, aşa cum se întâmplă de exemplu la formarea compuşilor de coordinaţie cu ionii iodură, rodanură etc.

Stabilitatea compuşilor de coordinaţie ai biometalelor cu aminoacizii se modifică destul de puţin cu modificarea radicalului hidrocarbonat, cu toate că poate să se modifice suficient cu introducerea în aminoacid a unor grupări funcţionale(mai ales -SH, heterociclii cu azot sau grupările -COOH).

Tabelul III.3 : Constantele de stabilitate (log K_1) a compuşi de coordinaţielor biometalici cu α-aminoacizii.

Aminoacidul	H^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Fe^{3+}
Glicina	9,78	1,38	≈2	3,2	4,3	5,23	6,18	8,62	5,52	4,8	10,0
Alanina	9,87	1,24	1,96	3,02	-	4,82	5,96	8,5	5,21	4,2	10,4
Valina	9,62	-	-	2,84	3,39	-	5,45	7,92	5,00	4,57	9,6
Leucina	9,77	-	-	2,78	3,42	4,49	5,58	7,89	4,92	3,99	9,9
Norvalina	9,70	-	-	3,30	-	4,8	5,68	8,07	5,09	4,29	-
Fenilalanina	9,18	-	-	-	3,26	-	-	7,74	-	-	8,9
Prolina	10,48	-	-	3,34	4,07	4,89	6,15	8,37	5,36	4,40	10,0
Serina	9,24	1,43	-	-	-	-	5,48	-	-	-	9,20
Treonina	9,00	-	-	-	3,30	-	-	-	-	6,3?	8,6
Cisteina	10,51	-	<4?	4,1	6,2	9,3	10,48	-	9,86	-	-
Metionina	9,34	-	-	2,87	-	-	5,59	-	4,38	3,88	9,1
Triptofan	9,55	-	-	2,88	3,43	-	-	-	-	-	9,0
Tirosina	10,07	1,48	≈2	2,4	-	-	-	-	-	-	-
Acid asparagic	9,47	1,60	2,43	3,74	4,34	5,9	7,12	9,32	5,84	4,39	11,4
Asparagina	8,85	-	-	-	-	4,55	5,58	7,78	-	-	8,6
Acid glutamic	9,95	1,43	1,9	3,3	4,6	5,06	5,90	7,85	5,45	4,78	12,1?
Ornitina	10,67	-	-	<2	3,09	4,02	4,85	6,9	4,10	3,70	8,7
Lisina	10,72	-	-	2,18	4,5	-	-	-	-	-	-
Arginina	9,05	-	1,30	2,00	2,86	3,87	4,92	7,34	4,19	3,27	8,7
Histidina	9,16	-	-	3,58	5,85?	6,65	8,69	10,56	6,63	5,75	4?
Oxiprolina	9,47	0,48	-	-	3,94	4,81	5,92	8,33	-	-	9,0

Tabelul III.4. Constantele de stabilitate ($logK_1$) a compuşilor de coordinare ai biometalelor cu peptide, aminoacizi şi amidele lor

Ligand	H^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Fe^{3+}
Glicina	9,78	1,38	≈2	3,20	4,30	5,23	6,18	8,62	5,52	4,80	10,0
Glicilglicina	8,1	1,24	1,34	2,20	2,62	3,49	4,49	6,60	3,80	3,33	9,10
Glicilglicilglicina	8,09	-	1,85?	1,41	-	2,98	3,70	5,41	3,33	2,70	-
Glicinamida	7,99	-	-	1,50	-	2,71	4,18	5,50	3,28	-	-
Alanina	9,82	1,24	1,96	3,02	-	4,82	5,96	8,50	5,21	4,20	10,4
Glicilalanina	8,22	-	-	-	-	3,23	-	-	4,1	2,60	-
Alanilglicina	8,17	0,66	-	-	-	-	-	-	3,0?	3,0	-
Alanilalanina	8,14	-	-	-	-	2,63	-	-	-	-	-
Leucina	9,77	-	-	2,78	3,42	4,49	5,58	7,00	4,92	3,99	9,90
Glicilleucina	8,38	-	-	-	-	-	-	6,10	3,60	3,10	-
Leucilglicilglicina	7,94	-	-	-	-	2,16	3,16	3,82	2,50	2,13	-

Tabelul III.5 Constantele de stabilitate (log K_1) a compuşilor de coordinare ai biometalelor cu unele baze heterociclice cu azot, nucleozide şi nucleotide

Ligand		Cationul										
Denumire	Formula	H^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Fe^{3+}
Adenina	$C_5H_5N_5$	9,83	-	-	-	-	-4,2	4,37	7,4	-	-	-
Adenozina	$C_{10}H_{13}O_4N_5$	3,6	-	-	-0,82	-	-0,3	-0,17	0,87	-0,28	-	-
Adenozin-5'-monofosfat	$C_{10}H_{14}O_7N_5P$	6,45	1,43	1,68	2,19	-	2,64	2,84	3,18	2,72	-	-
Adenozin-2'-monofosfat	$C_{10}H_{14}O_7N_5P$	6,01	1,83	1,93	2,38	-	2,24?	2,81	3,16	2,64	-	-
Adenozin-3'-monofosfat	$C_{10}H_{14}O_7N_5P$	5,83	1,8	1,89	2,28	-	2,2?	2,79	2,96	2,6	-	4,2
Adenozin-5'-difosfat	$C_{10}H_{15}O_{10}N_5P_2$	6,44	2,86	3,17	4,16?	-	4,2	4,5	5,9	4,28	-	5,2?
Adenozin-5'-trifosfat	$C_{10}H_{16}O_{13}N_5P_3$	6,53	3,97	4,22	4,52	-	4,86	5,02	5,82	4,85	-	5,4?
Adenozintetrafosfat	$C_{10}H_{17}O_{16}N_5P_4$	6,79	-	4,22	-	-	-	-	-	-	-	-
Uracil	$C_4H_3O_2N_2$	9,3	-	-	-	-	-	-	4,5	-	-	-
Uridina	$C_9H_{12}O_6N_2$	9,2	-	-	-	-	-	-	4,2	-	-	-
Uridin-5'-monofosfat	$C_9H_{13}O_9N_2P$	-	-	1,69	-	-	-	-	-	-	-	-
Uridin-5'-difosfat	$C_9H_{14}O_{12}N_2P_2$	7,16	-	3,44	-	-	-	-	-	-	-	-
Uridin-5'-trifosfat	$C_9H_{15}O_{15}N_2P_3$	9,5	3,71	4,02	4,78	-	4,55	-	-	-	-	6,53
Citidina	$C_9H_{13}O_5N_3$	12,3	-	-	-	-	-	-	1,59	-	-	-
Citidin-5'-monofosfat	$C_9H_{14}O_8N_3P$	6,35	-	-	-	-	-	-	-	2,54	-	-
Citidin-5'-difosfat	$C_9H_{15}O_{11}N_3P_2$	-	-	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Citidin-5'-trifosfat	$C_9H_{16}O_{14}N_3P_3$	5,97	3,81	4,01	4,78	-	4,78	-	-	-	-	6,18
Cianozina	$C_{10}H_{13}O_5N_5$	9,24	1,23	3,0	-	4,3?	3,2	3,8	≈6	4,6	4,0?	-
Cianozinmonofosfat	$C_{10}H_{14}O_8N_5P$	-	-	1,76	-	-	-	-	-	-	-	-
Cianozindifosfat	$C_{10}H_{15}O_{11}N_5P_2$	-	-	3,42	-	-	-	-	-	-	-	-
Cianozintrifosfat	$C_{10}H_{16}O_{14}N_5P_3$	9,6	3,58	4,02	4,73	-	4,63	-	7,7	-	-	-

Tabelul III.6. Constantele de stabilitate (log K_1) a compușilor de coordinare ai biometalelor cu liganzi biologici specifici

Ligand	H^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Fe^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Fe^{3+}
Acid gluconic	3,86	2,16	0,70	-	-	-	-	-	1,7	-	-
Acid ascorbic	11,34	0,19	-	-	-	-	-	1,57	-	-	-
Riboflavina	9,93	-	-	3,40	7,10	3,90	3,40	6,00	5,6	4,7	-
Riboflavinlipofosfat	9,88	-	-	5,74	-	5,8	5,57	8,27	6,02	-	-
Nicotinamida	-	-	-	-	1,00	-	1,49	1,84	1,1	-	-
Histamina	9,87	-	-	2,98	5,80	5,16	7,07	9,48	5,38	4,83	3,72
Imidazol	7,06	0,08	-	1,65	3,20	2,47	3,09	4,31	2,57	2,7	-

De remarcat este şi stabilitatea foarte apropiată a compuşilor de coordinaţie ai zincului şi cobaltului. Probabil aceasta este una din cauzele posibilităţii de schimb în enzime a ionilor de Zn^{2+} cu ionii de Co^{2+} fără o modificare semnificativă a activităţii catalitice a enzimei.

În tabelul III.4 sunt prezentate constantele de stabilitate ale compuşilor coordinativi ai biometalelor cu peptidele şi amidele aminoacizilor.

Din datele prezentate în tabelul III.4 rezultă că cu trecerea de la aminoacizi la peptide stabilitatea compuşilor de coordinaţie scade cu toate că gruparea -NH-CO- la peptide rămâne reactivă.

Seria stabilităţii compuşilor de coordinaţie, funcţie de natura biocationilor, se păstrează aşa cum era de aşteptat:

$Ca^{2+}<Mg^{2+}<Mn^{2+}<Fe^{2+}<Cd^{2+}<Co^{2+}<Zn^{2+}<Ni^{2+}<Cu^{2+}<Fe^{3+}$.

Se păstrează şi ecuaţiile de corelare de tip III.12 dar valorile lui a şi b diferă destul de mult în acest caz.

În tabelul III.5 sunt prezentate constantele de stabilitate ale compuşilor de coordinare ai biocationilor cu unele baze heterociclice cu azot (nucleozide şi nucleotide).

Ca şi în cazurile anterioare şi în această situaţie coordinarea se efectuează numai prin atomii de oxigen şi azot, dar stabilitatea compuşilor de coordinaţie din seria biocationilor este în principiu aceeaşi.

În tabelul III.6 sunt prezentate date din literatura de specialitate ale constantelor de stabilitate caracteristice compuşilor de coordinaţie ai biometalelor cu alţi bioliganzi.

Conform acestor date se poate trage concluzia că are loc o modificare a succesiunii stabilităţii în seria de mai sus a biometalelor, în cazul compuşilor de coordinare ai acidului gluconic (stabilitatea compuşilor de coordinare cu Ca^{2+} este mai mare decât cea a compuşilor de coordinare cu Mg^{2+}), cu riboflavina, riboflavinfosfatul, histamina şi imidazolul. Putem aprecia însă că nu sunt excluse şi o serie de erori care au apărut în literatura de specialitate care pot fi datorate condiţiilor experimentale. În timpul investigării formării compuşilor de coordinare cu liganzi macromoleculari apar o serie de întrebări care se referă în primul rând la concentraţia liganzilor. Dacă macromolecula ar fi avut o structură strict regulată (când se repetă în lanţ unităţi identice), în acest caz concentraţia ligandului poate fi egalată cu cantitatea de atomi donori din molecula biopolimerului, care sunt capabili să interacţioneze cu ionii metalici. În primă aproximaţie, într-adevăr în unităţile de acizi nucleici pot

fi considerate egale grupările fosfat şi radicalii de hidrocarbură, dar diferite baze heterociclice cu azot, pot prezenta afinităţi diferite faţă de ionii biometalelor. Precizăm că în macromoleculele de proteină există grupări aminice terminale, grupări carboxilice terminale şi grupări peptidice -CO-NH- pe lanţ care sunt capabile să formeze compuşi de coordinaţie.

Din cauza existenţei structurilor secundare şi mai ales a celor terţiare pot să apară pe lanţul macromolecular şi zone mai „convenabile" pentru coordinarea cu ionii biometalelor. Probabil că în cazul biopolimerilor cu următoarea structură generală prezentată schematic (figura III.2):

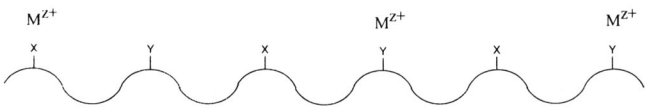


Figura III.2. Reprezentarea schematică a unui biopolimer cu grupări funcţionale complexabile.

este necesar să determinăm constante de stabilitate locale, referitoare la echilibre de următorul tip :

$$M^{z+} + X \rightleftharpoons M^{z+}X \qquad \beta \quad M^{z+}X \quad X^{-1}\,M^{z+\,-1} \qquad \text{(III.11)}$$

$$M^{z+} + Y \rightleftharpoons M^{z+}Y \qquad \beta \quad M^{z+}Y \quad Y^{-1}\,M^{z+\,-1} \qquad \text{(III.12)}$$

unde M^{z+} este concentraţia ionului metalic liber din soluţie ; X şi Y „concentraţiile" grupărilor donoare libere în biopolimer ; $M^{z+}X$ şi $M^{z+}Y$ „concentraţiile" grupărilor donoare X şi Y care sunt legate de ionul metalic.

Constantele locale (sau microscopice) de stabilitate pot fi determinate numai cu ajutorul metodelor fizice moderne (RMN, spectroscopie de vibraţie), care permit identificarea ionilor metalici legaţi de grupările funcţionale din biopolimeri şi determinarea „concentraţiei" grupărilor donoare libere.

Dacă biopolimerul are un număr destul de mic de grupări funcționale cu rol de ligand, capabile să coordineze, apar o serie de dificultăți în timpul etapei de determinare a constantelor de echilibru; ele sunt legate de determinarea concentrațiilor foarte mici în ioni metalici, deoarece la concentrații mari sunt foarte greu de observat modificările care au loc în timpul formării compusului coordinativ, din cauza concentrației molare scăzute în grupări donoare a biopolimerului (masa molară mare a biopolimerului). În acest caz pentru determinarea concentrațiilor la echilibru a ionilor metalici sunt utilizate metode catalitice. Valorile unor constante de stabilitate pentru compuși de coordinație ai ADN-ului (log K) cu unii ioni metalici sunt prezentate mai jos :

Ionii metalici	Na^+	K^+	Mn^{2+}	Cu^{2+}	Fe^{3+}
Log K	-0,15	-0,10	4,10	4,11	5,4

Constantele de stabilitate pentru compușii de coordinație ai Cu^{2+} și Fe^{3+} sunt determinate cu ajutorul metodei catalitice.

În timpul determinării constantelor de stabilitate pentru compușii de coordinare ai biometalelor cu proteinele prin metoda pH-metrică, apar o serie de dificultăți din cauza deformării posibile a structurilor terțiare și chiar a structurilor secundare, datorate modificărilor de pH. Constantele de stabilitate a compușilor de coordinație ai biocationilor cu proteinele, cum ar fi *carboxipeptidaza*, au fost determinate prin folosirea mai multor metode. Printre acestea titrarea potențiometrică care în acest caz implică utilizarea liganzilor concurenți, capabili să coordineze cu ionii metalici.

În cazul carboxipeptidazei seria stabilității biocationilor se modifică și cel mai stabil devine complexul cu Zn^{2+} după cum se vede în tabelul III.7.

Tabelul III.7. Constantele de stabilitate a compușilor de coordinație ai biometalelor cu carboxipeptidaza și carboanhidraza

	Carboxipeptidaza		Carboanhidraza	
Metal	pH = 8	pH ≠ 8	pH = 5,5	pH ≠ 5.5
Mn^{2+}	5,6	-	3,8	-
Co^{2+}	5,8	10,1	7,2	-
Ni^{2+}	5,7	-	9,5	-
Cu^{2+}	5,1	-	11,6	-
Zn^{2+}	8,3	12,6	10,5	15,0
Cd^{2+}	7,9	12,8	9,2	-

Ionii de Na^+ şi K^+ nu formează compuşi de coordinare stabili cu liganzii obişnuiţi. În organism ei sunt incluşi în componenţa *ionoforilor* adică a compuşilor care transferă ionii prin biomembrane penetrând bariera lipidică.

Ionoforii care se întâlnesc în natură diferă unii de alţii prin masa moleculară care variază între 200 şi 2000 şi prin unităţile structurale care formează oligomeri sau polimeri.

Unul din primii ionofori caracterizaţi şi studiaţi (Brokman, 1953) a fost antibioticul valinomicina, a cărui structură a fost determinată între anii 1963 şi 1965 de către Şemiachin.

Valinomicina formează compuşi de coordinaţie „transportabili" destul de stabili cu ionii de K^+ şi nu formează compuşi de coordinaţie stabili cu ionii de Na^+, diferenţa dintre constantele lor de stabilitate fiind mai mare de 10^5. În ionoforii naturali, în componenţa macrociclurilor intră de la 18 (eneatina) până la 36 de atomi (valinomicina). Aceste macrocicluri sunt alcătuite din resturi de acizi carboxilici care coordinează cu ionii metalelor alcaline prin oxigenul carboxilic din grupările esterice. Ionoforii de acest tip se numesc macrotetralide printre ele fiind nonactina, monoactina, dinactina, trinactina, tetranactina etc. Un alt tip de ionofori sunt formaţi din resturi de acizi carboxilici şi resturi de aminoacizi formând depsipeptide (figura III.3):

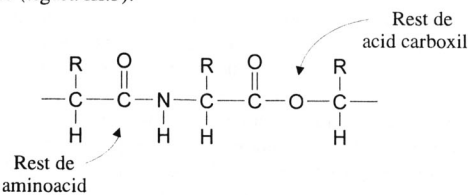


Figura III.3. Grupările funcţionale complexabile din structura ionoforilor.

Lanţurile depsipeptidice se pot închide în macrocicluri. Enniantinele sunt o familie de haxadepsipeptide care conţin un ciclu de 18 atomi. Hidroxiacidul este acidul D-hidroxiizovalerianic care alternează cu un N-metil-L-aminoacid. În enniantina A, B şi C aminoacizii sunt izoleucina, valina şi respectiv leucina. În structura de mai jos s-a prezentat enniantina B (figura III.4).

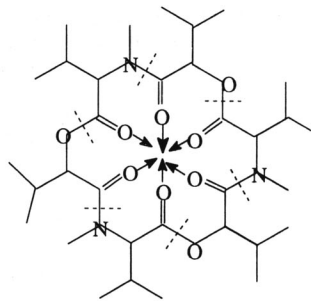
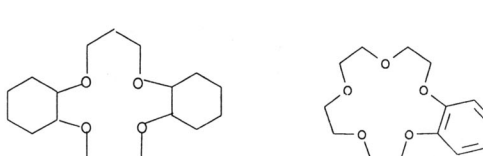


Figura III.4. Reprezentarea schematică a Enniantina B, cu precizarea grupărilor funcţionale.

În acest macrociclu în calitate de atomi donori funcţionează atomii de O carbonilic din grupările esterice şi peptidice. Un macrociclu mai complex alcătuit din 36 de membrii, este valinomicina care include 6 resturi de aminoacizi şi 6 resturi de acizi carboxilici; ca atomi donori funcţionează atomii de O carbonilic din grupările amidice care au o afinitate mare faţă de ionii metalelor alcaline. Precizăm că ionoforii pot fi formaţi şi numai din resturi de aminoacizi (polipeptidele). De asemenea precizăm că unii ionofori nu conţin macrocicluri ce au grupări carboxilice libere.

În ultimul timp, o mare atenţie se acordă unor polieteri macrociclici obţinuţi prin sinteză chimică. Dintre aceştia fac parte polieterii ciclici tip „coroană" în primă aproximare liganzi bidimensionali şi cei biciclici sau „criptaţii" care sunt liganzi tridimensionali (figura III.5, III.6 şi III.7).



14-Coroană-4 benzo-15-Coroană-5

Figura III.5. Eteri „coroană" cu structură bidimensională.

În denumirea acestor compuși „coroană" se referă la polieterii macrociclici. Înaintea cuvântului coroană se indică numărul atomilor care formează macrociclul, iar după el numărul heteroatomilor (atomilor de oxigen) din polieter.

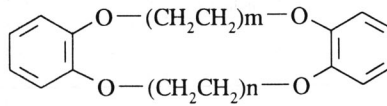


Figura III.6. Exemple de polieteri „coroană" de tip macrociclic.

m=n=2	dibenzo-18-coroană-6
m=2, n=3	dibenzo-21-coroană-7
m=n=3	dibenzo-24-coroană-8
m=n=4	dibenzo-30-coroană-10

Dibenzocoroanele fac parte dintr-un grup de „coroane" mai bine studiate până în prezent. Unele caracteristici ale acestora sunt prezentate în tabelulIII.8.

După cum rezultă din tabelul III.8, constantele de stabilitate ale compușilor de coordinare ai dibenzocoroanelor cu ionii metalelor alcaline depind într-un grad destul de mare de dimensiunile „golului". În principiu pot fi găsiți reactivi selectivi pentru cuplurile de ioni Li^+/Na^+, Na^+/K^+. Selectivitatea pentru cuplul K^+/Rb^+ și chiar pentru cuplul K^+/Cs^+ este cu mult mai mică.

O selectivitate mai mare față de ionii metalelor alcaline și alcalino-pământoase o au criptații, adică eterii biciclici la care în calitate de atomi terminali funcționează atomi de N dintr-o amină terțiară :

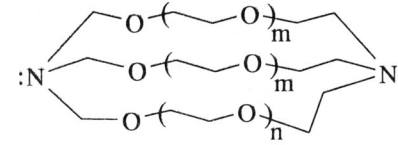


Figura III.7. Compuși de tip „criptat" cu structură tridimensională.

Tabelul III.8. Diametrul golurilor în eterii coroană şi constantele de stabilitate a compuşilor cu metalele în metanol

Denumirea coroanei	Diametrul golului (Å)	Logaritmul constantelor de stabilitate a complecşilor „coroanelor" cu biometalele		
		Na^+	K^+	Cs^+
Diciclohexil-14-coroană-4	1,2-1,5	2,2	1,3	-
Benzo-15-coroană-5	1,7-2,2	3,7	3,6	2,8
Dibenzo-18-coroană-6	2,6-3,2	4,4	5,0	3,6
Dibenzo-21-coroană-7	3,4-4,3	2,4	4,3	4,2
Dibenzo-24-coroană-8	-	-	3,5	3,8
Dibenzo-30-coroană-10	-	2,0	4,6	-

În literatură sunt descrişi următorii criptaţi :

m=n=0	(1,1,1)
m=0, n=1	(2,1,1)
m=1, n=0	(2,2,1)
m=n=1	(2,2,2)
m=1, n=2	(3,2,2)
m=2, n=1	(3,3,2)
m=n=3	(3,3,3)

După cum rezultă din tabelul III.9, în cazul criptaţilor, un rol deosebit în timpul formării compusului de coordinaţie îl joacă dimensiunea golului.

Astfel criptatul (2,1,1) cu dimensiunea golului de 1,6 Å este selectiv faţă de ionii de Li^+, criptatul (2,2,1) este selectiv faţă de ionul de Na^+, criptatul (2,2,2) prezintă o afinitate maximă faţă de ionii de K^+.

Ionoforul natural valinomicina are o selectivitate specifică faţă de ionii de potasiu.

Tabelul III.9. Prezentarea comparativă a unor criptaţi şi a complexului cu valinomicina

Tipul criptatului	Diametrul golului (Å)	Numărul heteroatomilor donori (N şi O)	Logaritmul constantelor de stabilitate a complecşilor criptaţi cu ioni în apă								
			Li^+	Na^+	K^+	Rb^+	Cs^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Sr^{2+}	Ba^{2+}
(2,1,1)	1,6	5	5,3	2,8	<2	<2	<2	-	2,8	<2	<2
(2,2,1)	2,2	6	2,5	5,4	3,9	2,55	<2	<2	6,95	7,35	6,3
(2,2,2)	2,8	7	<2	3,9	5,4	4,35	<2	<2	4,4	8,0	9,5
(3,2,2)	3,6	8	<2	1,65	2,2	2,05	2,2	2	≈2	3,4	6,0
(3,3,2)	4,2	9	<2	<2	<0,7	<2	<2	<2	<2	≈2	3,65
(3,3,3,)	4,8	10	<2	<2	<2	≤0,5	<2	<2	<2	<2	-
Valinomicina	-	6 (6)	<0,7	0,67	4,9	5,26	4,41	-	-	-	-

În caracterizarea termodinamică a reacţiilor de acest tip s-au determinat constantele de stabilitate şi căldurile de reacţie. Cinetica reacţiilor de formare a compuşilor coordinativi între biometale şi bioliganzi nu este încă suficient de bine studiată.

Majoritatea reacţiilor de formare şi de disociere a compuşilor coordinativi din organismele vii se petrec foarte repede. Se presupune că în multe din aceste reacţii de schimb cu liganzii, prima etapă este reacţia de eliminare a apei din ionul aquacoordinat , şi de aceea reacţiile de formare a compusului coordinativ dintre biometale şi diferiţi bioliganzi se petrec aproximativ cu aceeaşi viteză.

Constantele de viteză pentru disocierea aquaionilor biometalelor în biocation şi apă sunt prezentate în tabelulIII.10.

Tabelul III.10. Constantele de viteză pentru disocierea aquaionilor

Ionul	k, sec^{-1}	Ionul	k, sec^{-1}
Na^{+}	$8{,}8.10^{7}$	Mn^{2+}	3.10^{7}
K^{+}	$1{,}5.10^{8}$	Fe^{2+}	3.10^{6}
Mg^{2+}	1.10^{5}	Co^{2+}	2.10^{6}
Ca^{2+}	1.10^{8}	Ni^{2+}	2.10^{4}
Zn^{2+}	3.10^{7}	Cu^{2+}	2.10^{8}
Cd^{2+}	5.10^{9}		

Analizând datele din tabelul III.10 se observă vitezele foarte mari ale reacţiior de disociere a aquaionilor metalelor alcaline, aquaionului de calciu, cupru şi cadmiu, constanta de disociere cea mai mică având-o aquaionul de nichel.

Constantele de viteză pentru reacţiile de disociere a compuşilor de coordinaţie ai biocationilor cu liganzi macrociclici şi mai ales macrobiciclici sunt cu câteva ordine de mărime mai mici decât constantele de disociere ale compuşilor de coordinaţie cu liganzi aciclici.

CAPITOLUL IV

LEGĂTURA CHIMICĂ ÎN COMPUŞII COORDINATIVI AI BIOMETALELOR

Atomul central, în compusul coordinativ interacţionează cu liganzi care îl înconjoară datorită unor interacţiuni electrostatice şi covalente. Sarcina pozitivă a ionului central interacţionează cu sarcinile negative localizate pe liganzi sau cu dipolii moleculelor polare. Tipul electrostatic de interacţiune nu este unicul nici pentru compuşii de coordinaţie ai ionilor metalelor alcaline, chiar dacă este important. În cazul altor compuşi de coordinaţie (mai ales ai metalelor de tranziţie) rolul dominant îl joacă tipul covalent de interacţiune conform mecanismului de donor-acceptor.

În majoritatea cazurilor, dacă interpretăm legătura chimică prin Metoda Orbitalilor Moleculari (MOM) orbitalii atomului donor (ai liganzilor) cu perechile de electroni neparticipanţi, φ_L formează orbitali moleculari comuni cu orbitalii ionului central φ_M (figura 1). Toţi orbitalii pot fi descrişi cu ajutorul relaţiilor :

$$\Psi_B = N(\varphi_M + \lambda\varphi_L \quad (\lambda > 0) \qquad \text{(IV.1)}$$

$$\Psi_A = N^*(\varphi_M - \lambda^*\varphi_L) \quad (\lambda < 0) \qquad \text{(IV.2)}$$

unde Ψ_A şi Ψ_B sunt orbitalii de legătură şi respectiv antilegătură a complexului; N şi N^* factori de normare; Ψ_M şi Ψ_L orbitalii atomici ai metalului şi respectiv ligandului; λ şi λ^* coeficienţii orbitalilor atomici ai ligandului.

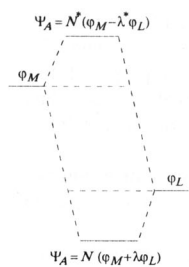


Figura IV.1. Schema simplificată a formării orbitalilor moleculari de către atomii metalului şi ligandului ;

Dacă orbitalul atomului central interacţionează (se suprapune) cu câţiva dintre orbitalii liganzilor, atunci în locul lui Ψ_L se va folosi o combinare liniară a orbitalilor liganzilor. În timpul formării legăturilor covalente în complex, un rol important îl joacă suprapunerea orbitalilor atomului central şi a liganzilor care poate fi caracterizată cu ajutorul integralei de suprapunere:

$$S = \int \varphi_M \varphi_L d\tau \qquad \text{(IV.3)}$$

Dacă orbitalul metalului se suprapune cu câţiva orbitali ai ligandului se utilizează integrale de suprapunere grupate:

$$G = \gamma \int \varphi_M \varphi_L d\tau \qquad \text{(IV.4)}$$

unde γ este factorul care ţine cont de tipul orbitalului Ψ_M şi de geometria complexului.

În primă aproximare, scăderea energiei în timpul formării orbitalului de legătură poate fi exprimată în felul următor:

$$\Delta E_B = H_L - E_{ML} = \frac{H^2{}_M G^2}{H_M - H_L} \qquad \text{(IV.5)}$$

H_M şi H_L sunt integralele culombiene a orbitalelor moleculare şi respectiv liganzilor. Valorile lor, cu o mare aproximaţie pot fi egalate cu potenţialele de ionizare .

Teoria Câmpului de Liganzi nu este altceva decât Metoda Orbitalilor Moleculari cu aproximaţiile adecvate compuşilor de coordinaţie ai metalelor. Această metodă se bazează pe teoria grupurilor care permite determinarea simetriei şi multiplicităţii OM, dar nu dă indicaţii asupra energiei lor.

Biometalele din categoria metalelor netranziţionale formează complecşi datorită orbitalilor s şi p ai stratului de valenţă a ionului central. Orbitalii de acest tip sunt în număr de patru (s, p_x, p_y şi p_z), iar numărul de coordinare în complecşii respectivi poate fi egal cu 5, 6, 7 sau chiar 8.

Pentru explicarea valorilor relativ mari a numerelor de coordinaţie pot fi făcute cel puţin trei presupuneri:

— prezenţa interacţiunii electrostatice (ionice) între ionul central şi liganzi este limitată numai de factorii geometrici (dimensiunile ionului central şi a liganzilor);

— participarea în formarea legăturii a orbitalilor d de energie mai înaltă; o aplicaţie de acest tip are un neajuns care constă în aceea că orbitalii d au o energie foarte înaltă, mai ales la un ion de tipul Mg^{2+};

— nu este neapărat necesară menţinerea principiului egalităţii numărului orbitalilor de valenţă ai ionului central cu numărul de coordinaţie.

Din analiza structurii complecşilor pot fi desprinse două aspecte: structura geometrică a complexului, adică distribuţia spaţială a ionului metalic central şi a atomilor donori ai liganzilor şi structura electronică a complexului adică caracteristica spectrală a densităţii electronice în complex, care este determinată de tipul orbitalilor moleculari, coeficienţii orbitalilor atomici, sarcinile efective pe atomii complexului coordinativ, etc.

La ionii în stare gazoasă cu structurile d incomplete, toţi cei cinci orbitali d sunt degeneraţi. Astfel ionul cu configuraţia d^1 este caracterizat de un termen spectral D de cinci ori degenerat; electronul poate fi situat pe oricare din cei cinci orbitali d identici.

În compusul coordinativ orbitalii d se află într-un câmp format de către liganzii coordinaţi şi din acest motiv degenerarea dispare (nu mai sunt identici). Diferenţa de energie între orbitalii de tip d în complex poate fi explicată ca rezultat al unei interacţiuni de natură electrostatică (TCC) sau aplicând TCL conform căreia orbitalii d ai atomului formează cu orbitalii liganzilor orbitali moleculari de energie diferită care depinde de mărimea integralei de suprapunere care este diferită pentru diferiţi orbitali. Deci în explicarea diferenţelor de energie a orbitalilor d (Δ) se disting teoria câmpului cristalin şi teoria câmpului de liganzi.

Teoria câmpului cristalin (TCC) are trei principii de bază:

— între ionul central şi liganzi există numai interacţiuni electrostatice (ion-ion sau ion-dipol);

— liganzii sunt consideraţi ca sarcini punctiforme sau dipoli care sunt situaţi la o distanţă strict determinată;

— orbitalii ionului central se consideră ca fiind izolaţi.

Cauza scindării orbitalilor d ai ionului metalic, degeneraţi în câmp de simetrie cubică în grupe de orbitali cu energii neegale constă în acţiunea diferită asupra lor a câmpului electrostatic produs de liganzi. Deci dacă liganzii sunt situaţi pe axele x şi y în vârfurile pătratului, orbitalul $d_{x^2-y^2}$ îndreptat în direcţia liganzilor are o energie mai ridicată decât orbitalul d_{xy} care este situat între axe (figura IV.2).

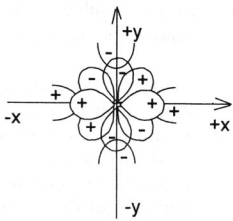


Figura IV.2. Suprapunerea orbitalilor d de tip σ în planul xy

O situaţie analoagă ar fi trebuit să fie şi în celelalte două plane (xy şi yz); dacă are loc o înconjurare octaedrică a ionului central se formează două grupuri de orbitali: doi orbitali mai bogaţi în energie e_g ($d_{x^2-y^2}$ şi d_{z^2}) şi trei orbitali identici mai săraci în energie t_{2g} (d_{xy} , d_{xz} şi d_{yz}). Teoria câmpului cristalin propune o ecuaţie pentru calculul mărimii acestei scindări. Mărimea scindării se notează cu Δ sau cu 10 D_q care în cazul presupunerii unei interacţiuni pur ionice poate fi calculată cu relaţiile:

$$\Delta = 10D_q = \frac{5}{3}\frac{AZ\bar{r}^4}{a_L^5} \qquad \text{(IV.6)}$$

sau

$$\Delta = 10D_q = \frac{5A\mu Z\bar{r}^4}{a_L^6} \qquad \text{(IV.7)}$$

În aceste ecuaţii A este o constantă utilizată pentru a trece la unităţile energetice date, $\bar{r}$ este raza medie a orbitalilor d, Z este sarcina ligandului, μ momentul de dipol, a distanţa dintre atomul central şi ligand. Din cauză că expresiile IV.6 şi IV.7 au fost deduse bazându-se pe presupunerea are loc numai o interacţiune electrostatică, deşi în compuşii de coordinaţie avem şi o interacţiune covalentă, rezultatele obţinute cu ajutorul formulelor date sunt destul de aproximative.

Dacă ne referim la *interacţiunea covalentă* de tip σ în acelaşi plan xy, orbitalii σ ai ligandului care se află pe axele de coordonate se suprapun numai cu orbitalii $d_{x^2-y^2}$ ai ionului metalic , iar suprapunerea cu orbitalul d_{xy} nu are loc şi acest orbital este un orbital de nelegătură (figura IV.3).

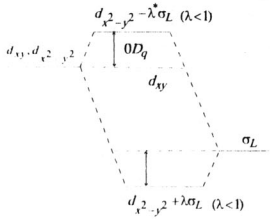


Figura IV.3. Nivelele energetice a orbitalilor în planul xy

O situație analoagă poate fi observată și în celelalte două plane xz și yz. Orbitalii de nelegătură d_{xy}, d_{xz} și d_{yz} se notează cu t_{2g}, iar orbitalii moleculari de antilegătură în care contribuția specifică o au orbitalii $d_{x^2-y^2}$ și d_{z^2} notați cu e_g. Calculul energiei de scindare $\Delta = 10\ D_Q$ în acest caz este destul de complex , dar în prima aproximație așa cum s-a arătat în ecuația IV.5 acest parametru este dat de relația IV.8:

$$\Delta = 10D_q = \frac{H_L{}^2 G^2}{H_M - H_L} \qquad \text{(IV.8)}$$

Energia de scindare în acest caz este determinată de factori care diferă suficient de cei de care se ținea cont în T.C.C. Totuși, numărul nivelelor energetice obținute prin scindare este identic în aceste două teorii, care diferă una de alta în sens fizic. Numărul și simetria nivelelor t_{2g} și e_g este determinată de simetria sferei interne a compusului de coordinare și de natura interacțiunii ionului metalic central cu liganzii.

În figura IV.4. este prezentată schema scindării nivelelor energetice de tip d în câmpurile cristaline de diferite simetrii și datorită unui număr diferit de liganzi (4 și 6).

Mărimea scindării în câmp tetraedric este mai mică de 4/9 ori în comparație cu acest parametru pentru câmpul octaedric format din aceiași liganzi:

$$\Delta_T = \frac{4}{9}\Delta_o \qquad \text{(IV.9)}$$

T.C.C. și T.C.L. dă posibilitatea de a se explica numeroasele caracteristici fizice și fizico-chimice a compușilor coordinativi ai metalelor de tranziție de tip d.

În primul rând, devine deosebit de clară împărțirea compușilor de coordinație ai metalelor din blocul d în complecși cu spin înalt (maxim) și complecși cu spin coborât (minim).

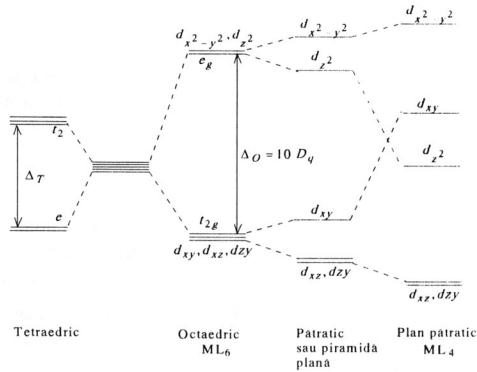


Figura IV.4. Schema scindării orbitalilor d în câmpuri de diferite simetrii.

Dacă o pereche de electroni ocupă unul şi acelaşi orbital, între ei apare o repulsie puternică care este caracterizată de o aşa-numită energie de cuplare, ceea ce are importanţă în modul de ocupare cu electroni a orbitalilor d şi implicit asupra caracteristicilor de spin ale ionului generator. (tabelul IV.1).

Tabelul IV.1 Caracteristicile de spin ale unor metale 3d cu rol biologic.

Ionul metalic	Configuraţia	Distribuţia electronilor pe orbitalii t_{2g} şi e_g	
		în complecşi cu spin înalt (spinul stării fundamentale)	în complecşi cu spin coborât (spinul stării fundamentale)
V^{5+} , Ti^{4+}	d^0	$(t_{2g})^0$ (0)	
V^{4+} , Ti^{3+}	d^1	$(t_{2g})^1$ (1/2)	
V^{3+} , Ti^{2+}	d^2	$(t_{2g})^2$ (1)	
Mn^{4+} , Cr^{3+} ; V^{2+}	d^3	$(t_{2g})^3$ (3/2)	
Mn^{3+} , Cr^{2+}	d^4	$(t_{2g})^3 (e_g)^1$ (2)	$(t_{2g})^4$ (1)
Mn^{2+} , Fe^{3+}	d^5	$(t_{2g})^3 (e_g)^2$ (5/2)	$(t_{2g})^5$ (1/2)
Fe^{2+} , Co^{3+}	d^6	$(t_{2g})^4 (e_g)^2$ (3)	$(t_{2g})^6$ (0)
Co^{2+} ; Ni^{3+}	d^7	$(t_{2g})^5 (e_g)^2$ (3/2)	$(t_{2g})^6(e_g)^1$ (1/2)
Ni^{2+} ; Cu^{3+}	d^8	$(t_{2g})^6 (e_g)^2$ (1)	
Ni^{+} ; Cu^{2+}	d^9	$(t_{2g})^6 (e_g)^3$ (1/2)	
Cu^{+} ; Zn^{2+}	d^{10}	$(t_{2g})^6 (e_g)^4$ (0)	

Dacă energia scindării orbitalilor Δ este mai mare decât energia de cuplare, electronii ocupă atunci nivelul energetic cel mai coborât cum ar fi nivelul t_{2g} în cazul complecşilor octaedrici. În acest caz se formează complecşi cu spin minim, iar dacă energia de scindare Δ a orbitalilor de tip d nu este prea mare electronii ocupă ambele nivele t_{2g} şi e_g în aşa fel ca numărul electronilor necuplaţi să fie maxim, obţinându-se complecşi cu spin înalt. Energia de cuplare P în aceste cazuri nu are o valoare constantă, dar este de aproximativ 20000 cm^{-1}.

Biocompuşii de coordinaţie ai Cu^{2+} pentru orice simetrie au un electron necuplat, ai Ni^{2+} în complecşii octaedrici au doi electroni necuplaţi.

Completarea cu electroni a nivelelor energetic mai coborâte, de exemplu t_{2g} în câmpul octaedric este mai avantajoasă decât completarea orbitalilor de tip e_g mai ridicaţi din punct de vedere energetic. În legătură cu aceasta, cu toate că există o tendinţă de creştere a stabilităţii biocomplecşilor în seria :

$$Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+}$$

totuşi creşterea stabilităţii biocomplecşilor nu este monotonă şi compuşii de coordinaţie ai Zn^{2+} sunt mai puţin stabili decât compuşii analogi ai Ni^{2+} şi Cu^{2+}.

În câmpul de simetrie octaedrică, biocomplecşii Ni^{2+} trebuie să fie mai stabili decât biocomplecşii analogi ai Cu^{2+}. Acest efect de stabilizare suplimentară a compuşilor de coordinaţie, pe baza repartiţiei neuniforme a electronilor în nivelele energetice obţinute după scindare, se numeşte energie de stabilizare în câmp de liganzi.

TCL ne permite să discutăm şi formarea biocompuşilor de coordinaţie cu legături π spre deosebire de TCC care nu permite acest lucru. Într-adevăr, dacă în planul xy atomul donor al ligandului are un orbital de tip p el poate interacţiona cu orbitalul d_{xy} al atomului metalic după tipul π. Pot fi posibile două cazuri:

În primul caz orbitalul metalului este liber iar orbitalul de tip p al ligandului este ocupat cu o pereche de electroni. Energia orbitalului de tip p al ligandului este mai mică decât energia orbitalului d al metalului. În acest caz se formează doi orbitali moleculari comuni: cel completat este localizat predominant pe ligand iar cel liber sau completat parţial pe metal. Legătura π de acest tip se numeşte legătură π-donoare sau legătură π directă. Este evident că legăturile de tip π pot fi realizate în toate cele trei plane xy, xz şi yz şi pot aparţine la diferite tipuri de simetrii. De exemplu,

în cazul coordinării octaedrice orbitalii π au simetrie t_{2g} (figura IV.5) şi în acest caz energia orbitalului t_{2g} creşte iar distanţa între orbitalii t_{2g} şi e_g, $\Delta = 10D_q$ scade.

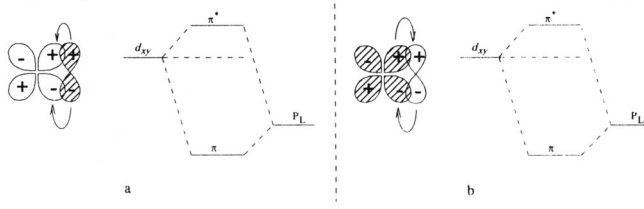


Figura IV.5. Schema formării legăturilor π donoare (a) şi π dative (b)

Tipul de interacţiune discutat aici este caracteristic pentru toţi liganzii cu atomi donori cu mai mult de o pereche de electroni neparticipanţi (H_2O, R-OH, Cl^-, I^-, S^{2-}, R-S^-, etc). În timpul formării legăturilor π directe densitatea electronică se deplasează de pe ligand pe metal.

În al doilea caz are loc un proces opus. Orbitalul d_{xy} al ionului metalic este ocupat de o pereche de electroni iar orbitalii de tip p sau d ai atomului donor din ligand sunt liberi. În acest caz se formează tot doi orbitali moleculari dar orbitalul de energie mai joasă (OML) este localizat predominant pe ligand. În acest caz densitatea electronică se deplasează parţial de pe metal pe ligand şi sarcina pozitivă a metalului creşte. Legăturile π de acest tip se numesc dative sau legături π retrodonoare. Ele pot fi localizate în planele xy, xz sau yz şi pot avea diferite simetrii. În complecşii octaedrici ele au simetria t_{2g} .

Apariţia legăturilor π retrodonoare duce la creşterea parametrului $\Delta = 10\ D_Q$ deoarece orbitalii e_g şi t_{2g} se îndepărtează unul de altul. Formarea legăturilor π retrodonoare este caracteristică pentru liganzi de tipul CO, C_2H_4, ^-CN, şi pentru halogenuri de tipul Cl^-, Br^-, I^-, deoarece aceşti ioni au orbitali nd vacanţi de o energie destul de joasă.

Legătura chimică poate fi formată numai la interacţiunea orbitalilor atomului central şi a liganzilor de simetrie identică. În acest caz, după cum s-a mai arătat, atomul central poate avea nu numai un rol de acceptor de electroni dar şi de donor de electroni (legătura π retrodonoare) .

În legătură cu aceasta, este necesar să utilizăm clasificarea atomilor centrali şi a liganzilor propusă anterior, bazată pe simetria orbitalilor. Schematic această clasificare poate fi prezentată în felul următor:

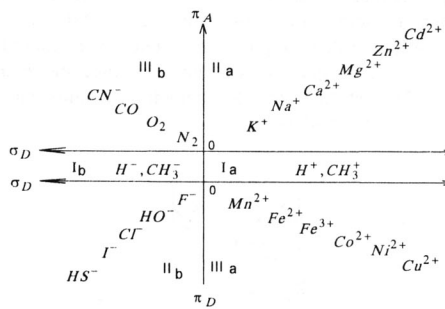


Figura IV.6. Clasificarea atomilor centrali şi a liganzilor bazată pe simetria orbitalilor. (cu σ_A , σ_D , π_A , π_D s-a notat capacitate acceptoare sau donoare de dip σ sau π)

Primului grup aparţin particule care sunt capabile să aibă rol numai de acceptori σ (H^+, CH^{3+}, BR_3) şi care formează respectiv numai legături σ. Pe de altă parte, capabili de a forma numai legături σ sunt liganzii NH_3, amine şi anioni CH_3^- şi H^-. Aceste particule aparţin grupelor I_a şi I_b .

În al doilea grup intră cationii (II_a) care sunt acceptori σ şi π ai electronilor : Na^+, Li^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Pb^{2+} , Sn^{2+}, Cd^{2+} , Bi^{3+} şi anionii (II_b) donori σ şi π ai electronilor: F^-, HO^-, Cl^-, Br^-. Acestui grup îi mai aparţin moleculele de H_2O, R-OH, etc.

Al treilea grup este alcătuit din atomi centrali şi liganzi care pot avea simultan două funcţii opuse: ioni care pot forma complecşi- acceptori σ şi donori π (III_a) : Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Pd^{2+}, Pt^{2+} şi liganzi acceptori π şi donori σ (IIIb) : O_2, CNS^-, R_3P, CO, CN^-, $C_5H_5^-$.

Conform regulilor stricte de simetrie a orbitalilor, a particulelor care interacţionează, reacţiile de complexare respectiv de coordinare trebuie să decurgă conform schemelor: I_a cu I_b ; II_a cu II_b ; III_a cu III_b.

Clasificarea propusă este o clasificare condiţionată deoarece ea ţine cont numai de unul sau doi orbitali ai generatorului de complex şi ai liganzilor. Dar în numeroase cazuri, trebuie să ţinem cont de trei sau chiar

mai mulţi orbitali după considerentele de simetrie. Astfel, ionul I⁻ conţine orbitali σ şi π donori cum ar fi orbitalii 5p, şi σ şi π acceptori datorită includerii în legătură a orbitalilor 5d de o energie relativ scăzută.

Datele experimentale şi de calcul mecano-cuantic cu privire la structura electronică a compuşilor coordinativi de tip ML_6 de simetrie octaedrică O_h ai biocationilor de tip d pot fi prezentate schematic în figura 7 unde se indică distribuţia spaţială şi schema orbitalilor moleculari. Se observă că în figura IV.7 se ţine cont de interacţiunea dintre biocationul central şi atomii donori din ligand, de tip σ .

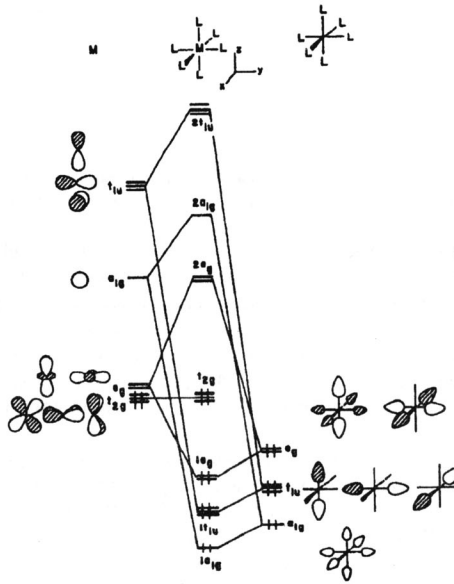


Figura IV.7. Schema OM în complexul octaedric la formarea numai a legăturilor σ. Fiecare ligand este reprezentat numai printr-un singur orbital σ.

În acest caz la formarea orbitalilor moleculari pot participa nu numai orbitalii 3d dar şi orbitalii 4s şi 4p ai generatorului de complex. Liganzii participă la formarea fiecărui orbital molecular cu 6 orbitali σ donori care posedă perechi de electroni neparticipanţi:

$$\sigma_1 , \sigma_2 , \sigma_2 , \sigma_4 , \sigma_5 , \sigma_6 .$$

O altă geometrie spaţială întâlnită frecvent la biocationi corespunde grupului de simetrie punctual D_{4h}. Schema orbitalilor moleculari a unui compus de coordinaţie ML_4 cu geometrie plan-pătrată este prezentată în figura IV.8.

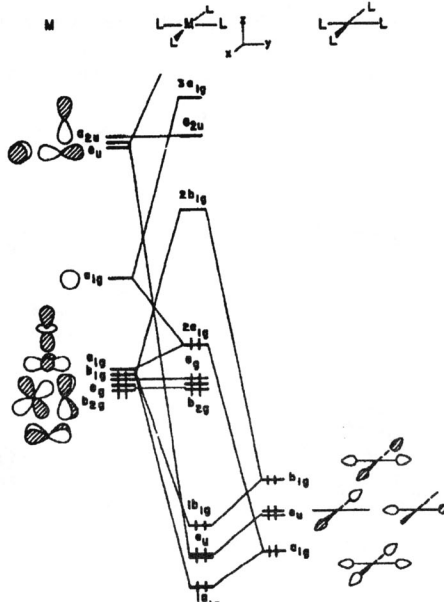


Figura IV.8. Diagrama orbitalilor moleculari pentru un complex ML_4 de simetrie D_{4h}. Fiecare ligand este reprezentat de un singur orbital σ.

În aproximația în care fiecare ligand nu participă decât cu un singur orbital (de tip σ) orbitalii d_{xy}, d_{xz} , d_{yz} nu se amestecă cu orbitalii liganzilor. Orbitalul d_{z^2} este puțin destabilizat de liganzi. Cel mai destabilizat este orbitalul $d_{x^2-y^2}$ ai cărui lobi sunt îndreptați spre liganzi. Configurația electronică prezentată în figura IV.7 corespunde unei configurații electronice d^8, de exmplu ionul Ni(II). Într-un astfel de câmp de liganzi ionul Ni(II) va fi caracterizat de un spin S = 0.

Un compus de coordinație ML_4 poate prezenta deasemenea o geometrie tetraedrică (grup de simetrie T_d). Transformarea orbitalilor moleculari din complexul plan-patrat în cei ai complexului tetraedric este prezentată în figura IV.9. Ordinea orbitalilor de tip d este inversă față de cea caracteristică geometriei octaedrice. Acest tip de structură îl putem întâlni la centrul activ al proteinelor Fe-S sau al plastocianinei (figura II.2).

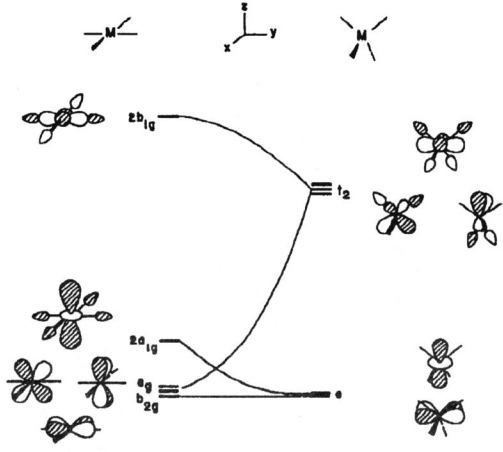


Figura IV.9. trecerea de la geometria plan-pătrată la geometria tetraedrică.

Un alt număr de coordinație întâlnit în compușii de coordinație cu rol biologic este 5. O geometrie posibilă pentru un complex de tipul ML_5 este piramida pătrată de simetrie C_{4v}. Ionul metalic nu este situat în mod

obligatoriu în plan ecuatorial. Un parametru structural important este unghiul θ. Un astfel de exemplu este centrul activ al deoxihemoglobinei prezentat în figura IV.10.

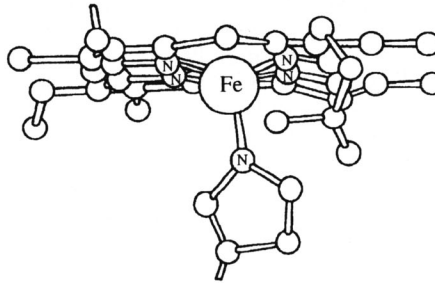


Figura IV.10. Centrul activ al deoxihemolglobinei.

În figura IV.11. este prezentată variația energiei orbitalilor moleculari de tip d în funcție de unghiul θ.

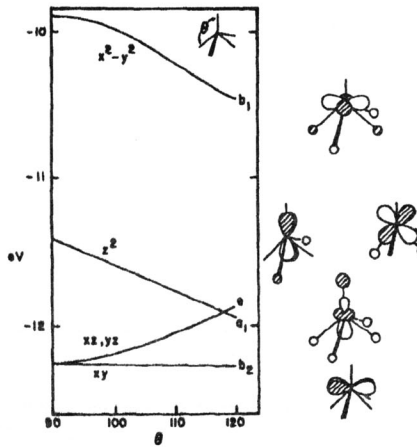


Figura IV.11. Variația în funcție de unghiul θ a orbitalilor d pentru un sistem ML_5.

Orbitalul $d_{x^2-y^2}$ este stabilizat pentru că el nu mai este îndreptat exact spre liganzi. Orbitalul d_{z^2} este de asemenea stabilizat pentru că acoperirile de legătură cu orbitalii liganzilor cresc. Efectul global este acela că orbitalii sunt mai puțin dispersați din punct de vedere energetic când unghiul θ crește. Aceasta este explicația faptului că în dezoxihemoglobină (unde $\theta = 110^0$) ionul Fe(II) este spin înalt.

În figura IV.11 se prezintă formarea orbitalilor moleculari σ și π care implică participarea exclusivă a orbitalilor d ai generatorului de complex. În acest caz interacțiunea orbitalului de tip d al biocationului cu orbitalii π liberi ai bioliganzilor este mai puternică decât interacțiunea cu orbitalii π ocupați cu electroni ai acestora. În concluzie putem spune ca interacțiunea π dativă este preponderentă comparativ cu cea π donoare.

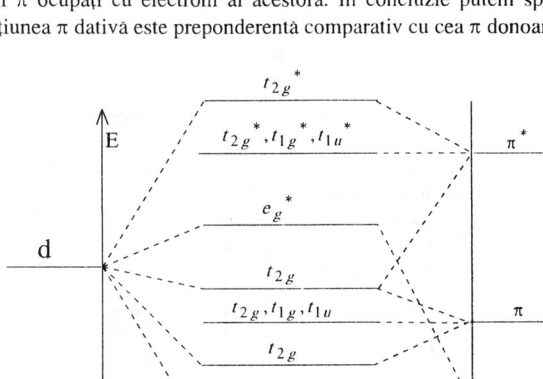


Figura IV.12.Schema OM formate din orbitalii d ai metalului la formarea legăturilor σ și π.

Din figura IV.12 se observă că în afară de orbitalii moleculari de legătură (OML) și orbitalii moleculari de antilegătură (OMA) pot să se formeze și orbitali moleculari de nelegătură (OMN) cum ar fi t_{2u}, t_{1g} și t_{1u},

care sunt localizaţi pe liganzi şi nu iau parte la formarea legăturii chimice cu biocationul generator de complex.

Pentru determinarea nivelelor energetice şi a tipurilor de orbitali moleculari, deci a coeficienţilor pentru orbitalii atomici, se utilizează de obicei calcule mecanic-cuantice cu folosirea unor parametrii empirici motiv pentru care metodele de calcul mecanic-cuantic se mai numesc metode semiempirice. În calitate de astfel de parametri se aleg parametrii orbitalilor atomici de tip Slater şi energiile lor (respectiv potenţialele de ionizare ale stărilor de valenţă).

Datele obţinute din aceste calcule energetice pentru orbitalii moleculari şi pentru distribuţia densităţii electronice în compuşii de coordinaţie sunt destul de aproximative. Totuşi, numărul orbitalilor moleculari formaţi şi simetria lor nu depind de metoda de calcul şi în limitele de aproximare pentru un singur electron rezultatele obţinute sunt destul de bune.

Pentru înţelegerea multor fenomene care pot fi observate în timpul formării compuşilor de coordinaţie ai biocationilor de tip d un rol important îl are efectul Jahn-Teller. În anul 1937 Jahn-Teller au dat o teoremă importantă care se enunţă astfel: " starea energetică degenerată pentru orice sistem molecular neliniar nu este stabilă deoarece un sistem de acest tip este supus unei deformări care reduce simetria lui şi ridică degenerarea".

Efectul Jahn-Teller este ilustrat cel mai des în literatura de specialitate în cazul compuşilor de coordinaţie ai Cu^{2+}. În complexul octaedric, în acest caz repartizarea celor nouă electroni în orbitalii de tip d este t_{2g}^{6} şi e_g^{3}. Se observă că toţi cei trei orbitali t_{2g} sunt completaţi identic fiecare cu câte o pereche de electroni dar completarea nivelului e_g se poate realiza în două moduri $d^{2}_{x^2-y^2}$ $d^{1}_{z^2}$ şi $d^{1}_{x^2-y^2}$ $d^{2}_{z^2}$. Deoarece ambele stării corespund uneia şi aceeaşi energii sistemul este degenerat de două ori (simetrie e_g) şi conform teoremei lui Jahn-Teller în sistem trebuie să se producă o scădere a simetriei în timpul căreia degenerarea dispare.

Distorsiunea se face întâmplător, dar mai ales de-a lungul unor axe de simetrie. Cel mai adesea această scădere a simetriei poate decurge în două moduri:

— transformarea octaedrului în " bipiramidă pătratică" întinsă pe axa z, când $E_{d_{z^2}} < E_{d_{x^2-y^2}}$;

— transformarea octaedrului în " bipiramidă pătratică" turtită dealungul axei z când $E_{d_{z^2}} > E_{d_{x^2-y^2}}$.

La modificarea configurației spațiale a complexului, deci la transformarea octaedrului în bipiramidă pătratică se modifică desigur și caracterul și respectiv energia nivelului de tip t_{2g}, dar aceste transformări sunt cu mult mai mici din cauza caracterului lor de orbitali moleculari de nelegătură (OMN), când formează o legătură π slăbită sau de orbitali moleculari de antilegătură (OMA). Modificările care pot fi observate la extinderea octaedrului pe axa z sunt prezentate în figura IV.13.

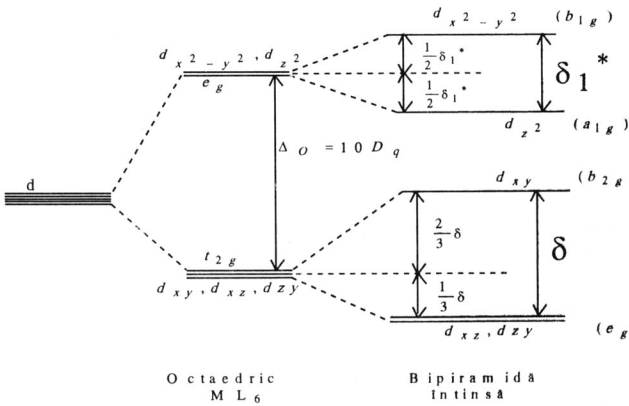


Figura IV.13. Modificarea energiei OM la transformarea octaedrului (ML_6) în bipiramidă întinsă pe axa z.

Într-adevăr coordinarea în compușii coordinativi ai Cu^{2+} decurge în așa fel încât liganzii se situează în vârfurile octaedrului puternic deformat. Practic sunt cunoscute cazuri când "întinderea" octaedrului pe axa z duce la transformarea compusului coordinativ octaedric în complex pătratic.

Conform celor expuse, efectul Jahn-Teller trebuie să se manifeste mai puternic în compușii de coordinație cu o degenerare pe orbitalii e_g

adică în compuşii $(t_{2g})^6 (e_g)^3$, $(t_{2g})^3 (e_g)$ şi în compuşii cu spin scăzut $(t_{2g})^6 (e_g)$. Acest efect se manifestă mai puţin în compuşii coordinativi cu spin înalt cu următoarea repartizare a electronilor $(t_{2g})^1$, $(t_{2g})^2$, $(t_{2g})^4 (e_g)^2$, $(t_{2g})^5 (e_g)^2$ şi în compuşii de coordinaţie cu spin coborât de tip $(t_{2g})^5$. Precizăm că efectul Jahn-Teller nu trebuie să se manifeste deloc în compuşii cu spin înalt care prezintă următoarea repartizare a electronilor $(t_{2g})^3$, $(t_{2g})^3 (e_g)^2$, $(t_{2g})^6 (e_g)^2$.

Într-adevăr în compuşii de coordinaţie octaedrici ai Mn^{2+}, Fe^{3+} şi Ni^{2+} nu se observă o coordinare octaedrică deformată. Deformări mici ale simetriei octaedrice au loc în compuşii de coordinaţie ai Fe^{2+} şiCo^{2+} şi deformări deosebit de pronunţate în cazul Cu^{2+}. Şi în compuşii de coordinaţie tetraedrici poate fi observat efectul Jahn-Teller.

Din acest punct de vedere foarte interesanţi sunt compuşii de coordinaţie tetraedrici ai Co^{2+} cu o structură electronică $(e)^4 (t_2)^3$, adică orbitali mai ridicaţi energetic nedegeneraţi şi de aceea stabili conform teoremei amintite. Stabili sunt şi ionii de Mn^{2+}, Fe^{3+} şi Zn^{2+} în câmp tetraedric de intensitate redusă.

Ceilalţi compuşi de coordinaţie ai biocationilor cu bioliganzii în câmpul de simetrie tetraedrică pot suferi modificări conform teoremei lui Jahn-Teller.

CAPITOLUL V

METODE FIZICE UTILIZATE ÎN STUDIUL STRUCTURII COMPUŞILOR COORDINATIVI AI BIOMETALELOR CU BIOLIGANZII

În capitolul anterior a fost menţionat faptul că determinarea structurii compuşilor coordinativi implică rezolvarea a două aspecte:

— determinarea structurii geometrice, adică determinarea plasării în spaţiu a nucleelor atomilor, a atomului metalic central şi a nucleelor atomilor care intră în componenţa liganzilor coordinaţi cu atomul central;

— determinarea structurii electronice, adică stabilirea distribuţiei (repartiţiei) densităţii electronice în compusul coordinativ şi determinarea nivelelor energetice ale electronilor interiori şi de valenţă (în aproximarea pentru un singur electron).

Între aceste două aspecte ale noţiunii "structură" a compusului coordinativ există o legătură strânsă şi un număr de metode fizice (în special spectrale) permit într-un mod oarecare să elucideze ambele aspecte.

Pentru determinarea structurii electronice a complexului pot fi utilizate metode directe şi indirecte:

— spectroscopia fotoelectronică şi röentgenoelectronică;

— spectroscopia de vibraţie (spectrele IR şi difuzie combinată); în acest caz poate fi obţinută informaţia indirectă cu privire la structura geometrică a complexului;

— spectroscopia RMN şi ENDOR (Electron-Nuclear Double Resonance).

— spectroscopia de rezonanţă prin raze γ (efectul Mössbauer).

În cazul compuşilor de coordinaţie formaţi de ionii metalelor tranziţionale, pentru determinarea structurii geometrice în afară de metodele menţionate mai pot fi utilizate:

— spectroscopia de absorbţie în UV-VIS şi IR apropiat;

— studiul activităţii optice în lumină polarizată (dicroism circular) şi dispersie optică rotatorie;

— determinarea susceptibilităţii magnetice, cu metodele care utilizează acest parametru;

— studiul modificărilor paramagnetice în spectrele RMN.

— studiul soluţiilor sau a compuşilor coordinativi în stare amorfă prin metoda EXAFS (Extended X-ray Absorbţion Fine Structure).

— analiza prin difracţie cu raze X a compuşilor coordinativi în stare cristalină etc.

Cele mai directe şi probabil cele mai sigure metode pentru determinarea structurii geometrice a compuşilor de coordinaţie sunt metodele de difracţie şi în special analiza prin difracţie cu raze X. Cu ajutorul analizei cu raze X a fost stabilită structura unui număr mare de compuşi coordinativi printre care şi a compuşilor coordinativi cu bioliganzii. Utilizarea acestei metode este limitată la substanţele cristaline. Determinarea structurii substanţelor în stare lichidă şi în soluţie prin această metodă este destul de dificilă sau chiar imposibilă.

Analiza prin difracţie cu raze X necesită o aparatură specială şi o metodologie destul de complicată a descifrării datelor obţinute şi de aceea nu vom prezenta nici măcar principiile acestei metode, cu atât mai mult cu cât aceste principii sunt discutate foarte mult în literatura de specialitate.

Dintre celelalte metode fizice de investigare a structurii compuşilor coordinativi cu biometalele vom discuta cele mai importante metode utilizate pentru soluţionarea problemelor chimiei bioanorganice.

Aceste metode sunt universale în studiul compuşilor chimici iar posibilitatea utilizării lor în bioanorganică diferă de la caz la caz. Caracteristicile acestor metode sunt prezentate în tabelul V.1.

Se ştie din prezentările anterioare că, ionii metalici cu toate că sunt esenţiali, intervin în cantităţi foarte mici în procesele biologice. Pentru studierea rolului lor în sistemele vii sunt deci necesare metode spectroscopice foarte sensibile. În prezent, din cele enumerate, în bioanorganică cele mai utilizate sunt două tehnici spectroscopice: spectroscopia de Rezonanţă Paramagnetică Electronică (RPE), şi ENDOR (Electron-Nuclear Double Resonance). Ambele metode sunt bazate pe fenomene cuantice de interes general.

RPE şi ENDOR se aplică sistemelor al căror spin electronic este diferit de zero. Acesta este cazul a numeroşi ioni metalici, precum şi al radicalilor organici care au spinul electronic S = 1/2.

RPE permite: urmărirea gradului de oxidare a unui ion metalic în timpul unei reacţii chimice, cunoaşterea simetriei înconjurării chimice a acestui ion metalic, detectarea prezenţei spinilor electronici în vecinătatea ionului studiat şi dacă există în ce număr. Este o metodă de mare sensibilitate.

ENDOR permite identificarea atomilor legaţi direct de ionul metalic.

Desigur pot fi utilizate numeroase alte tehnici pentru înţelegerea funcţiilor ionilor metalici în moleculele care conţin metale. Astfel studiul prin radiocristalografie al structurii proteinelor este de o mare importanţă pentru că acestă metodă permite accesul la detalii de structură ale centrilor activi, care conţin ioni metalici.

Creşterea cristalelor materialelor biologice este un proces foarte delicat. Deseori astfel de cristale nu pot fi obţinute. În ultimii ani s-a dezvoltat o metodă care poate fi aplicată în studiul soluţiilor sau a compuşilor amorfi. Este vorba de metoda EXAFS (Extended X-Ray Absorption Fine Structure). Această metodă se bazează pe analiza detailată a unei regiuni speciale a spectrului de absorbţie a razelor X de un ion metalic şi permite măsurarea destanţelor metal-ligand. Această metodă studiază ce se întâmplă în vecinătatea imediată a metalului şi deci nu necesită o structură spaţială periodică aşa cum este necesar în radiocristalochimie. Metoda de analiză EXAFS nu s-a dezvoltat decât recent pentru că necesită o radiaţie X de intensitate uniformă în funcţie de energie, iar astfel de surse au fost obţinute utilizând radiaţia sincotronă. Astfel de echipament există la Universitatea Paris Sud Orsay în cadrul Laboratorului de Utilizare a radiaţiei electromagnetice, în Germania la Hamburg şi în Statele Unite ale Americii. Un sincotron special realizat pentru acest tip de cercetări a fost construit de Comunitatea Europeană la Grenoble.

V.1 Spectroscopia röentgenoelectronică şi fotoelectronică

Principiile spectroscopiei röentgenoelectronice şi fotoelectronice sunt identice şi relativ simple. Proba studiată se supune acţiunii iradierii cu raze X sau radiaţie strict monocromatică. În acest caz din stratul atomului (cel intern sau de valenţă) este scos un electron care are o energie cinetică ce poate fi uşor măsurată :

$$E_K\left(E_K = \frac{mv^2}{2}\right) \qquad (V.1)$$

$$h\nu + \left(e_{\text{legătură}}\right) \rightarrow e$$

În acest caz energia electronului care se află pe orbitalul atomic sau molecular poate fi calculată uşor :

$$E_{legătură} = h\nu - \frac{mv^2}{2} \qquad (V.2)$$

De exemplu, la investigarea compusului $Na_3[(CN)_5FeN_2]$ în spectrul röentgenoelectronic se obţin trei benzi pentru electronii interni ai azotului (1s). Fiecare bandă corespunde atomului de azot care este legat cu atomul central de fer în diferite moduri.

Tabelul V.1. Carcteristicile utilizării unor metode fizice în investigarea compuşilor coordinativi

Metoda	Domeniul utilizării	Frecvenţa utilizării
Spectroscopia röentenoelectronică şi fotoelectronică	Investigarea amplasării nivelelor energetice a orbitalilor completaţi cu electroni interni şi de valenţă	Utilizarea este destul de limitată
Spectroscopia de vibraţie (IR şi difuzia combinată)	Investigarea modului de coordinare a liganzilor şi a modificărilor care au loc în molecula ligandului prin coordinare	Destul de limitată din cauza complexităţii sistemului
Spectroscopia de absorbţie în regiunea UV - VIS a spectrului (spectroscopia electronică)	Investigarea complecşilor formaţi, a modului de coordinare, a geometriei sferei interne de coordinare (complecşii biometalelor cu orbitali d şi f incompleţi)	Destul de mare
Determinarea densităţii optice, dicroismului circular şi diepersiei optice rotatorii	Determinarea configuraţiei complecşilor cu bioliganzii (complecşii metalelor de tranziţie)	În ultimul timp destul de mare
Determinarea susceptibilităţii magnetice	Determinarea tipurilor de complecşi (complecşii metalelor de tranziţie)	Destul de mare
RPE	Determinarea tipurilor de complecşi, geometriei, caracteristicilor legăturii chimice (complecşii metalelor de tranziţie)	Destul de mare
RMN care include măsurarea deplasărilor paramagnetice în spectrele RMN ale liganzilor coordinativi şi a timpului de relaxare	Investigarea modificărilor deplasărilor chimice a diferitelor molecule la coordinare ; stabilirea modului de coordinare a ligandului, geometriei lui şi a labilităţii în sfera internă (complecşii metalelor de tranziţie)	Medie ; în ultimul timp creşte
Spectroscopia de rezonanţă γ (Mossbauer)	Investigarea structurii complecşilor liganzilor cu ionii de fer şi posibil cu cei de cobalt	Medie
ENDOR	Măsurarea directă a cuplării între un spin electronic şi spinul unui nucleu şi permite de asemenea identificarea acestui nucleu.	Medie ; în ultimul timp creşte
EXAFS	În mod particular bine adaptată la studierea înconjurământului atomilor metalici în metaloenzime poate fi aplicată soluţiilor	Medie

Cea mai intensă bandă din spectru corespunde celor cinci atomi de azot din ionii ^-CN iar cele mai puţin intense corespund atomilor de azot din molecula de N_2 coordinată.

Analizând spectrul, se pot trage concluzii cu privire la modul de coordinare al acestei molecule, liniară sau aproape liniară. Dacă această coordinare ar fi perpendiculară : , ambele benzi ale electronilor 1s ai atomului de azot ar fi fost identice.

Este interesant de menţionat că între plasarea benzii care corespunde elctronilor 1s interni ai azotului şi sarcina efectivă a atomului de azot există o corelare liniară destul de evidentă.

Metoda spectroscopiei röentgenoelectronice se mai numeşte spectroscopie electronică pentru analiza chimică. Totuşi mai corectă este denumirea de spectroscopie röentgenoelectronică şi fotoelectronică. Ele diferă una de alta cantitativ: în metoda spectroscopiei röentgenoelectronice pentru investigare se utilizează radiaţia X de energie înaltă capabilă să scoată electroni nu numai din orbitalii atomici de valenţă, dar şi din cei interiori; în metoda spectroscopiei fotoelectronice se utilizează lumina UV. Metoda spectroscopiei fotoelectronice permite investigarea nivelelor energetice ale electronilor de valenţă.

Metodele de spectroscopie röentgenoelectronică şi fotoelectronică sunt puţin utilizate pentru investigarea compuşilor în chimia bioanorganică, din cauza aparaturii complexe şi a dificultăţii metodelor.

Între timp aceste metode s-ar fi putut utiliza pentru investigarea înconjurării apropiate a biometalelor în compuşii de coordinare care conţin atomi de O, N, S şi pentru investigarea nivelelor energetice ale biometalelor şi a orbitalilor moleculari care coordinează complexul dat.

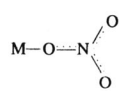
V.2. Spectroscopia de vibraţie

Spectroscopia de vibraţie (spectrele IR şi de difuzie combinată) pot da o informaţie foarte preţioasă cu privire la structura primei sfere de coordinare a compuşilor coordinativi şi al modului de coordinare cu diferiţi liganzi. În spectrele de vibraţie pot fi observate frecvenţe care corespund diferitelor moduri de vibraţie (de valenţă, de deformare, de legănare etc). În unele cazuri se utilizează aproximarea care permite de a evidenţia frecvenţele caracteristice legăturilor chimice date. Astfel în regiunea IR îndepărtată pot fi observate vibraţiile de valenţă a legăturii metal-ligand care sunt deosebit de importante pentru chimia compuşilor coordinativi. În spectrul de vibraţie al compusului coordinativ pot fi observate şi benzile

cracteristice frecvenţelor de vibraţie ale liganzilor. La formarea compusului coordinativ ele pot fi scindate în câţiva componenţi din cauza scăderii simetriei ligandului la coordinare, sau pot să se deplaseze şi să-şi modifice intensitatea din cauza modificării deplasării densităţii electronice în molecula ligandului, după coordinare.

Drept exemplu poate fi aleasă coordinarea ionului NO_3^- care are o simetrie D_{3h} şi un număr de frecvenţe de vibraţie care corespund acestei simetrii. La coordinare (prin monodentare sau bidentare) simetria ionului NO_3^- coordinat scade până la C_{2v}, şi de aceea numărul benzilor din spectrul de vibraţie al ionului creşte :

Ionul NO_3^- liber
simetrie D_{3h}



Ionul NO_3^- coordinat
simetrie C_{2v}

Utilizarea spectroscopiei în IR pentru investigarea substanţelor cu activitate biologică este limitată când se lucrează în soluţii apoase pentru că apa, după cum se ştie, absoarbe puternic în domeniul infraroşu.

Totuşi, spectroscopia în infraroşu este utilizată cu succes pentru soluţionarea unor probleme în chimia bioanorganică. Astfel pentru investigarea cu ajutorul spectroscopiei în IR a legării moleculelor de CO_2 din carboanhidrază a fost stabilită apariţia asimetriei în moleculele coordinate de CO_2 şi legarea foarte slabă de metaloproteine (capitolul 7).

În legătură cu faptul că nu are loc o modificare suficientă a frecvenţelor în cazul coordinării moleculelor de către biometale este foarte avantajoasă şi prezintă un interes utilizarea. Cu ajutorul acestei spectroscopiei diferenţiale în IR a fost investigată coordinarea ionului azidă N_3^- cu ionii metalici (Zn^{2+} şi Co^{2+}) care intră în structura carboanhidrazei. A fost observat că banda intensă de la 2049 cm^{-1} se deplasează la coordinarea cu ionul de Co^{2+} până la 2081 cm^{-1} şi mai mult în cazul ionului de Zn^{2+} până la 2094 cm^{-1}. Unii liganzi se leagă mai puternic decât ionul N_3^- şi pot să-l elimine din metaloenzime.

V.3. Spectroscopia de absorbţie în domeniile ultraviolet vizibil

Spectroscopia de absorbţie în regiunile vizibilă şi ultravioletă a spectrului radiaţiilor electromagnetice se mai numeşte şi *spectroscopie*

electronică deoarece absorbţia cuantelor de lumină în această regiune este legată de deplasările electronilor. Spectroscopia electronică se utilizează cel mai des pentru investigarea compuşilor coordinativi ai metalelor de tranziţie. Nivelele energetice pentru complecşii corespunzători cu simetrie octaedrică sunt prezentate în figurile 4.3 şi 4.4. Din aceste figuri poate fi observat faptul că tranziţiile electronice pot fi de patru tipuri.

Cele mai frecvente şi mai uşor observabile sunt tranziţiile de două tipuri :

Tranziţiile d-d, adică tranziţiile electronilor între orbitalii d care sunt localizaţi predominant pe ionul central al complexului. Dintre aceste tranziţii fac parte tranziţiile $t_{2g} \leftrightarrow e_g$ [orbitali t_{2g} ai metalului pot fi de nelegătură, cu caracter predominant de legătură (la formarea legăturilor π-dative) şi cu caracter predominant de antilegătură (la formarea legăturilor π-donoare)]. Deoarece "culoarea" compusului coordinativ este determinată de tranziţiile d-d (cel mai mult) caracterul acestora depinde de natura înconjurării apropiate a atomului central (numărul atomilor vecini şi plasarea lor în spaţiu). Gruparea care conţine atomul central şi atomii liganzilor donori legaţi de dânsul se numeşte "cromofor". De exemplu pentru complexul $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ cromoforul este $Co^{II}O_6$.

Benzile de transfer de sarcină sunt caracterizate de o energie înaltă şi de o intensitate destul de mare. În acest caz electronii pot trece pe orbitalii ionului metalic de pe orbitalii localizaţi predominant pe liganzi (orbitalii de legătură σ a_{1g}, e_g, t_{1z} sau orbitalii de legătură π t_{2g} şi orbitalii de nelegătură localizaţi pe liganzi t_{1g}, t_{1u}, t_{2u} (t_{1u} poate caracteriza legăturile slabe cu orbitalii p ai metalului)). Electronii pot trece şi în sens opus de pe orbitalii ocupaţi cu electroni ai biocationului pe orbitalii π^* vacanţi, localizaţi pe liganzi.

Benzile Rydberg care sunt plasate în regiunea UV îndepărtat corespund tranziţiilor electronice de pe orbitalii d ocupaţi cu electroni ai metalului pe orbitalii p vacanţi ai metalului.

Aceste benzi sunt destul de intense. Benzile spectrale care corespund tranziţiei elctronului de pe orbitalii completaţi ai ligandului pe cei liberi sunt benzi intraligand. Astfel de benzi sunt caracteristice pentru liganzii cu legături conjugate. În timpul formării compusului coordinativ plasarea nivelelor energetice în molecula ligandului se modifică suficient şi deci se modifică poziţia acestor benzi. Spectrele de absorbţie ale compuşilor de coordinaţie metalici cu structura d^1 şi d^9 sunt destul de simple, dar la un număr mai mare de electroni $d^2 \div d^8$ apare o repulsie între

electronii de pe orbitali, ceea ce duce la creşterea complexităţii spectrelor electronice.

Chiar şi un ion în stare gazoasă care are mai mult de un electron d (şi mai puţin de 9), se caracterizează prin prezenţa câtorva nivele energetice (termeni spectrali). În compusul coordinativ numărul acestor nivele se măreşte; în acest caz cu cât este mai coborâtă simetria sferei interne a complexului cu atât numărul de nivele energetice este mai mare (deci şi a benzilor spectrale).

Cei mai simetrici compuşi coordinativi sunt complecşii cu coordinare octaedrică şi tetraedrică. Pentru astfel de compuşi Tanabe şi Sugano au trasat nişte diagrame energetice. Ele sunt prezentate pentru ionii biometalici [de structură : d^5 (Mn^{2+}, Fe^{3+}), d^6 (Fe^{2+}), d^7 (Co^{2+}), d^8 (Ni^{2+})] în figura V.1.

În diagramele Tanabe şi Sugano pe abscisă se indică valoarea Δ_0 (distanţa între orbitalii t_{2g} şi e_g) iar pe ordonată energia nivelului E. Pentru a obţine diagrame universale adică pentru orice ioni cu configuraţii electronice date, indiferent de sarcina lor şi de numărul cuantic principal, valorile Δ_0 şi E se împart cu parametrul de repulsie între electroni B (parametrul Racah). Valorile parametrului Racah pentru ionii în stare gazoasă ai biometalelor sunt prezentate în diagramele corespunzătoare. În compuşii coordinativi orbitalii d sunt delocalizaţi şi densitatea electronică se deplasează parţial pe ligand (ecuaţiile V.1 şi V.2). De aceea în compuşii coordinativi repulsia între electroni scade şi parametrul $B_{complex}$ este mai mic decât $B_{ion\ liber}$. Acest fenomen poartă denumirea de efect nefelauxetic iar valoarea lui este caracterizată prin raportul :

$$\eta = \frac{B_{complex}}{B_{ion\ liber}} < 1 \qquad (V.3)$$

Cu cât este mai mică valoarea η cu atât mai pronunţată este natura covalentă a complexului dat. Valoarea $B_{complex}$ poate fi găsită utilizând diagramele Tanabe-Sugano.

Numărul nivelelor energetice posibile în compusul coordinativ prezentate în diagramele Tanabe-Sugano este minim deoarece în cazul simetriei cubice (O_h şi T_d) nivelul d suferă scindarea în două subnivele (t_{2g} şi e_g sau t_2 şi e). În cazul simetriei mai scăzute numărul nivelelor energetice creşte (capitolul IV). Deci după numărul nivelelor şi caracterul lor pot fi trase unele concluzii cu privire la simetria primei sfere de coordinaţie în complex.

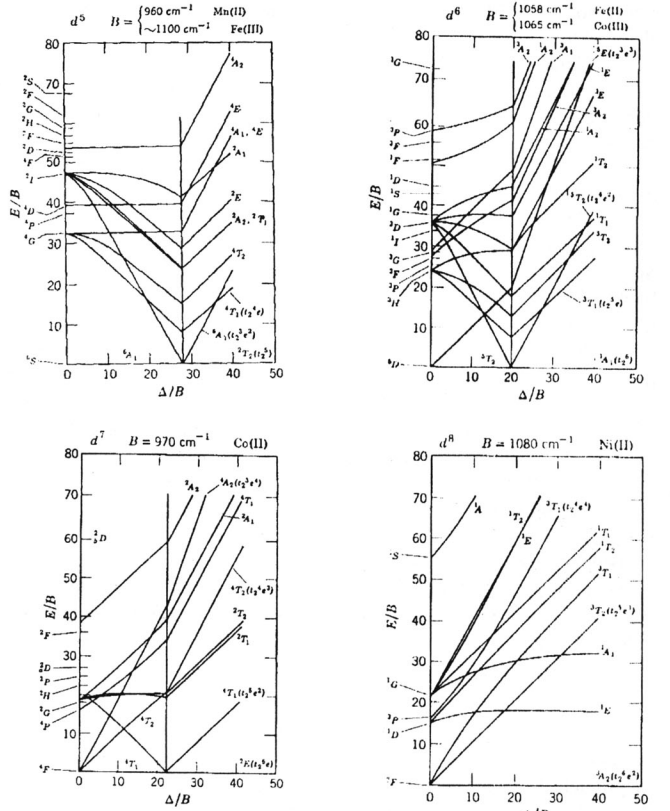


Figura V.1 : Diagramele nivelelor energetice pentru configurațiile d^5-d^8 de simetrie octaedrică (conform Tanabe și Sugano).

O semnificație deosebită poate avea și scindarea nivelelor energetice datorită interacțiunii spin-orbită, cu toate că în cazul ionilor

metalelor 3d ea este relativ mică. În fine la analiza spectrelor de absorbție este necesar să ținem cont și de intensitatea benzilor spectrale.

Cele mai intense sunt benzile transferului de sarcină (coeficientul molar de extincție este de ordinul 10^3-10^4) apropiate ca intensitate putând fi benzile tranzițiilor Rydberg și intraligand (din interiorul ligandului).

Benzile de absorbție datorate tranzițiilor d-d prezintă intensitate mică pentru ca aceste tranziții sunt interzise de regulile de selecție ale mecanicii cuantice. Dacă aceste reguli s-ar aplica cu strictețe nu ar trebui să observăm spectrul datorat câmpului de liganzi și nici culoarea ionilor metalelor tranziționale. Aceste benzi se observă în spectru datorită anumitor procese care fac ca o tranziție d-d interzisă să devină permisă (cuplarea vibronică și efectul Jahn-Teller). Spectrele de absorbție au fost utilizate cu succes în studiul compușilor de coordinație de Co^{2+} cu proteinele. În numeroase enzime Zn^{2+} poate fi substituit cu Co^{2+} fără modificarea structurii metaloproteinei și fără pierderea activității catalitice.

Tabelul V.2. Spectrele de absorbție ale metaloproteinelor cu Co (II)

Metaloenzima cu Co (II)	Amplasarea benzilor spectrale (nm) și intensitățile lor (coeficienți molari de extincție notați în paranteze)				
Co(II)-carboxipeptidaza	500 (-)	555 (160)	572 (160)	-	970 (25)
Co(II)-carboanhidraza	520 (205)	555 (340)	615 (250)	640 (240)	900 (25) 1250 (95)
Co(II)-carboanhidraza* + CN	-	545 (350)	585 (650)	-	-
Co(II)-fosfataza bazică	510 (335)	555 (328)	605 (220)	640 (260)	-
Co(II)-fosfataza bazică + HPO_4^{2}	480 (260)	535 (350)	-	640 (120)	-
Co(II)-fosfataza bazică + $HAsO_4^{2}$	500 (240)	550 (260)	-	-	-

* în spectru sunt benzi suplimentare la 310, 345, 450 nm.

Cu ajutorul acestei metode au fost investigate carboanhidrazele și un număr mare de metaloproteine. Unele rezultate sunt prezentate în tabelele V.3 și V.4.

În spectrele de absorbție ale compușilor cu cobalt poate fi observată o bandă largă în domeniul 500-640 nm cu câteva maxime. Uneori pot fi observate niște benzi mai puțin intense în regiunea IR apropiat. O astfel de structură a spectrului confirmă faptul că există o deformare a cromoforului tetraedric $Co(II)L_4$. Scindarea nivelelor în câmpul tetraedric este inversă în comparație cu cea din câmpul octaedric. Ionul gazos de Co^{2+} are doi

termeni spectrali "tetradegeneraţi" ^4F şi ^4P care se transformă într-un set de termeni spectrali A_2, T_2, $T_1(F)$ şi $T_1(P)$.

Tabelul V.3. Spectrele de absorbţie ale metaloproteinelor cu Cu (II)

Metaloenzima cu Cu (II)	Amplasarea benzilor spectrale (nm) şi intensităţile lor (coeficienţi molari de extincţie notaţi în paranteze)				
Cu(II)-carboxipeptidaza	-	-	-	790 (≈100)	-
Cu(II)-carboanhidraza	-	-	590 (50)	750 (100)	900 (75)
Cu(II)-carboanhidraza + CN^-	-	-	-	≈700 (130)	900 (80)
Cu(II)-fosfataza bazică	-	-	-	≈750 (100)	-
Cu(II)-lacaza*	-	532 (≈300)	615 (1400)	730 (500)	-
Cu(II)-azurina*	467 (400)	521 (300)	621 (2800,3500)	806 (600)	-
Cu(II)-ascorbatoxidaze*	412 (500)	-	606 (770)	-	-
Cu(II)-ceruloplasmine*	370 (500)	-	605 (1200)	-	-

* enzime care fac parte din grupul oxidazelor

Termenii A_2, T_2, $T_1(F)$ sunt foarte apropiaţi unii de alţi şi deci tranziţiile între ei se observă în regiunea UV a spectrului, iar tranziţia $A_2 \rightarrow T_1(P)$ apare în regiunea vizibilă a spectrului şi trebuie să fie intensă datorită suprapunerii puternice a orbitalilor d şi p în complexul tetraedric.

Scindarea nivelului $T_1(P)$ este însoţită de scăderea simetriei complexului până la C_{3v} sau chiar mai jos. Se poate presupune că în cromofor sunt ocupate trei poziţii de către grupările donoare ale proteinei iar a patra de către molecula de apă. Acest fapt confirmă şi posibilitatea substituirii apei cu alţi liganzi (de exemplu ^-CN) şi creşterea intensităţii benzii. Sustituirea a unu sau doi liganzi în fosfataza bazică cu HPO_4^{-2} şi $HAsO_4^{2-}$ modifică relativ puţin spectrul de absorbţie.

În spectrele de absorbţie ale compuşilor coordinativi ai Cu (II) cu simetrie înaltă (O_h şi T_d) trebuie să se observe o singură bandă ($^2E_g \rightarrow {}^2T_{2g}$ în octaedru sau $T_2 \rightarrow E$ în tetraedru). În realitate în spectrele compuşilor de

coordinație ai cuprului cu proteinele există câteva benzi sau o bandă foarte largă. Acest fapt poate fi aplicat prin aceea că coordinarea atomilor donori în jurul atomului de cupru este pătratică sau atomii donori se plasează în vârfurile tetraedrului deformat. Așa cum rezultă din schema prezentată în figura 4.4, pentru coordinarea pătratică ar fi trebuit să fie observate trei benzi de absorbție pentru configurația electronică d^9 : $B_{1g} \leftarrow E_g$, $E_{2g} \leftarrow E_g$ și $A_{1g} \leftarrow E_g$.

Natura benzilor de absorbție în spectrele compușilor de coordinație "albaștri" ai Cu (II) cu metaloproteine nu este clarificată până în prezent din cauză că este necesar să explicăm intensitatea mare a benzilor spectrale ($\varepsilon=10^3$). Au fost propuse două moduri de explicare a naturii acestor benzi :

— tranziția este de tip d-d dar intensitatea este ridicată datorită simetriei scăzute a înconjurării Cu (II) și datorită suprapunerii parțiale a nivelelor 3d, 4s și 4p ;

— are loc transferul sarcinii de tip $L \rightarrow Cu^{2+}$ (de tip π sau σ) de pe ligand (proteină) spre ionul de cupru.

Este posibil să existe și alți biocomplecși în care sarcina se transferă în sens opus: Cu (I) $\rightarrow$ L .

Natura benzilor spectrale în proteinele care conțin fer nu este până în prezent clarificată. Astfel, de exemplu, feredoxina absoarbe lumina la 230, 280, 310, 390 nm.

V.4. Dispersia optică rotatorie și dicroismul circular

În studiul sistemelor biologice se utilizează investigare activității optice și anume a *efectului Cotton* care constă în detectarea fenomenului dicroismului circular și a dispersiei optice rotatorii. Compușii coordinativi disimetrici se comportă în mod diferit la supunerea iradierii cu lumină polarizată, funcție de lungimea de undă a luminii utilizate. Modificarea unghiului de rotație a planului luminii polarizate notate prin α (valoarea lui α depinde de diferența indicilor de refracție a mediilor prin care trece fluxul luminos și este rotit la stânga sau la dreapta n_l-n_r) depinde de lungimea de undă a luminii și se numește dispersie optică rotatorie. În acest caz raza de lumină cu diferite direcții de rotație a planului luminii polarizate are și coeficienți molari de extincție diferiți. Diferența ε_l-ε_r poate fi măsurată cu ajutorul aparaturii speciale iar această diferență se numește dicroism circular. Efectul Cotton poate fi pozitiv când ε_l-$\varepsilon_r > 0$ sau negativ când ε_l-$\varepsilon_r < 0$. Sttidiul acestui efect este prezentat în figura V.2.

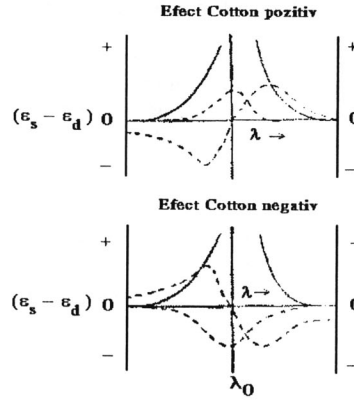


Figura V.2. Efectul Cotton : dicroismul circular (ε_l-ε_r) şi dispersia optică rotatorie (α) în cazul compusului asimetric cu banda de absorbţie în centrul căreia fiind lungimea de undă λ_0 : a) Efect pozitiv ; b) Efect negativ.

Efectul Cotton poate fi observat în compuşii coordinativi disimetrici adică în compuşi în care sunt absente axele de rotaţie-oglindire S_n de ordinul n. Este necesar să menţionăm că prezenţa S_1 este identică faţă de planul de simetrie iar S_2 faţă de centru de simetrie. Ca exemple pot fi enumeraţi compuşii coordinativi $M(AA)_3$ (unde AA este un ligand bidentat) sau cis $M(AA)_2X_2$.

Efectul Cotton poate fi observat în numeroase metaloenzime şi în special în toate proteinele studiate care conţin Co (III) şi Cu (II).

Este interesant că spectrele de absorbţie obişnuite ale fosfatazei bazice cu cobalt legat de anionul HPO_4^{2-} sau $HAsO_4^{2-}$ sunt aproximativ identice, iar spectrele dispersiei optice rotatorii şi dicroismului circular diferă suficient, nu numai în privinţa valorilor ε_l-ε_r cât şi ca sens.

V.5. Determinarea susceptibilităţii magnetice

Susceptibilitatea magnetică a compuşilor coordinativi ai metalelor 3d este determinată de prezenţa electronilor neîmperechiaţi pe orbitali, de

obicei ai generatorului de complex. Ea este proporțională cu mărimea momentului magnetic (pentru un singur electron) :

$$\mu = g\sqrt{S(S+1)} \qquad (V.4)$$

unde S este spinul electronului = 1/ 2 ; g este factorul giromagnetic g = 2,000023 (pentru majoritatea calculelor se ia valoarea 2); pentru un electron liber μ = 1,73 μB.

Dacă în ion sau atom există câțiva electroni neîmperechiați și între ei există interacțiune de spin atunci momentul magnetic este :

$$\mu_S = g\sqrt{S(S+1)} \qquad (V.5)$$

unde S este numărul cuantic de spin al ionului (atomului) care este egal cu numărul electronilor neîmperechiați înmulțit cu 1/ 2.

În tabelul V.4 sunt prezentate valorile μ_s calculate cu ajutorul acestei relații pentru toate bioelementele cu structurile lor electronice de valență. Așa cum rezultă din datele prezentate în tabelul V.4, valorile lui μ determinate experimental diferă suficient de cele calculate în presupunerea că au loc numai interacțiuni de spin pentru toți ionii afară de Mn^{2+} și Fe^{2+}.

Tabelul V.4. Caracteristicile magnetice ale ionilor biometalelor

Ionul	S	L	μ_S	μ_{S+L}	$\mu_{experimental}$
Mn^{2+}	5/ 2	0	5,92	5,92	≈5,9
Fe^{3+}	5/ 2	0	5,92	5,92	≈5,9
Fe^{2+}	2	2	4,90	5,48	5,1-5,5
Co^{2+}	3/ 2	3	3,87	5,2	4,1-5,2
Ni^{2+}	1	3	2,83	4,47	2,6-2,8
Cu^{2+}	1/ 2	2	1,73	3,0	1,7-2,2
Mo^{V}	1/ 2	2	1,73	3,0	1,67
Co^{3+}	De obicei sunt în starea cu spin scăzut și nu avem centru paramagnetic				

Acești ioni (Mn^{2+} și Fe^{2+}) în stare fundamentală au numărul cuantic orbital L=0 (termenul spectral ^6S). Pentru ceilalți momentul orbital nu este nul și de acest fapt trebuie să ținem cont. Dacă condiția orbitală ar fi fost completă în determinarea momentului magnetic, expresia corespunzătoare s-ar fi putut scrie :

$$\mu_{S+L} = \sqrt{4S(S+1)+L(L+1)} \qquad (V.6)$$

Dar valorile lui μ_{s+L} nu pot fi determinate experimental din cauza limitării mişcării orbitale în compusul coordinativ ("stingerea" momentului orbital ; vezi tabelul V.4).

La interacţiunea ionului cu liganzii pot apărea şi alte efecte fizice, mai sensibile care influenţează valoarea momentului magnetic. Măsurătorile experimentale de susceptibilitate magnetică nu necesită utilizarea unei aparaturi foarte complexe iar precizia este relativ mică.

În chimia bioanorganică această metodă este utilizată mai rar. Ca exemplu pot fi luate lucrările clasice ale lui Pauling şi Cornhall în care se arată că legarea O_2 cu hemoglobina transformă Fe^{2+} dintr-un ion paramagnetic într-un ion diamagnetic.

Au fost determinate momentele magnetice ale Co^{2+} în diferiţi derivaţi ai carboanhidrazei. Ionul de Co^{2+} se inhibă cu diferite adaosuri (tabelul V.5).

Tabelul V.5. Momentele magnetice ale Co (II) activ şi inhibat în Co-carboanhidrază

pH	Inhibitorul şi concentraţia lui (mM)	Momentul magnetic
7,9	-	4,23
6,2	Cl^- (100)	4,45
6,2	Sulfanilamidă (0,5)	4,72
6,2	NCO^- (2)	4,41
6,3	NO_3^- (100)	4,45

Momentele magnetice ale compuşilor de coordinaţie octaedrici ai cobaltului se află în limitele 4,7-5,2 iar pentru cei tetraedrici între 4,1-4,9. Datele prezentate precum şi datele obţinute prin interpretarea spectrelor elucidează coordinarea tetraedrică a Co (II) în metaloenzima dată (carboanhidraza).

A fost măsurată susceptibilitatea magnetică pentru feredoxină ($\mu = 2$). O explicaţie a acestei valori este dificil de dat.

V.6. Rezonanţa paramagnetică electronică

Rezonanţă Paramagnetică Electronică (RPE), cunoscută şi sub denumirea de Rezonanţa electronică de spin (RES) este o metodă avantajoasă pentru investigarea compuşilor coordinativi ai metalelor tranziţionale. În această metodă destul de bună se utilizează practic

existența diferenței în orientarea spinilor electronici într-un câmp magnetic puternic. Pentru un singur electron există două posibilități în orientarea lui în câmp magnetic: paralel și antiparalel, cu o anumită diferență de energie ΔE :

$$\Delta E = g\beta H \qquad (V.7)$$

unde g este factorul giromagnetic, β magnetonul lui Bohr iar H intensitatea câmpului magnetic. La un echilibru termic completarea cu electroni a norului interior este mai mare decât a celui exterior. Dacă sistemul este supus acțiunii unei iradieri cu frecvența ν pentru menținerea condiției de rezonanță :

$$h\nu = g\beta H \qquad (V.8)$$

se creează condiții optime pentru tranziția electronului de pe nivelul intern pe cel extern cu absorbție de energie. Condițiile rezonanței și deci a absorbției maxime de energie pot fi obținute la modificarea intensității câmpului cu frecvență dată. Același efect poate fi obținut și la modificarea frecvenței energiei radiației absorbite de frecvență ν.

Pentru electronul liber g = 2,00 iar pentru electronii din compușii coordinativi ce conțin ioni paramagnetici pot fi observate următoarele fenome :

1. Valoarea $g \neq 2,00$ din cauza contribuției momentului orbital; valoarea lui poate fi o măsură a gradului de covalență a legăturii.

2. Valoarea lui g depinde de direcția acțiunii câmpului magnetic și pentru cristale se observă fenomenul anizotropiei magnetice. În cazul cel mai simplu pot fi distinse două componente ale lui g: $g_\perp$ și $g_\parallel$ ($g_\parallel$ este componenta paralelă iar $g_\perp$ componenta perpendiculară). Relația dintre ele este următoarea :

$$g_{cp}^2 = \frac{1}{3}(g_\parallel^2 + 2\, g_\perp^2) \qquad (V.9)$$

Cu ajutorul spectrelor RPE în cristale pot fi determinate $g_\perp$ și $g_\parallel$ și este posibil să tragem concluzii cu privire la strucura sferei interne a compusului coordinativ.

3. Câmpul magnetic slab al ionului duce la apariția structurii superfine a spectrelor și depinde de mărimea momentului magnetic al nucleului (J). Numărul componenților spectrului superfin este egal cu 2J+1. La delocalizarea electronului neîmperechiat pe atomii liganzilor poate fi observată o structură hiperfină suplimentară, care este determinată de momentele magnetice ale nucleelor liganzilor. Cu cât legătura în

complex este mai covalentă cu atât mărimea scindării în spectrul hiperfin este mai mare.

4. Între electronii neîmperechiaţi şi reţeaua cristalină se stabileşte un echilibru termic. Timpul necesar pentru o astfel de stabilizare se numeşte timp de relaxare spin-reţea. Relaxarea spin-reţea duce la lărgirea liniilor în spectrele RPE. Uneori aceste linii se lărgesc atât de mult că nu ele nu pot fi observate pentru temperatură normală. În aceste cazuri spectrele RPE se efectuează la temperaturi foarte scăzute (temperatura azotului lichid sau heliului lichid).

Metoda RPE se caracterizează printr-o sensibilitate foarte înaltă şi permite detectarea până la 10^{-12} particule paramagnetice pe un litru. Pentru numeroşi complecşi ai biometalelor cu diferiţi liganzi au fost obţinute spectrele RPE. Unele caracteristici ale biometalelor care sunt importante pentru obţinerea spectrului RPE sunt prezentate în tabelul V.6.

După cum rezultă din datele prezentate în tabelul 20 mai avantajoase sunt spectrele RPE pentru compuşii care conţin Cu^{2+}, Mo^{V} iar la temperaturi scăzute cele pentru compuşii cu Mn, Fe şi Co.

Tabelul V.6. Unele caracteristici ale ionilor biometalici necesare pentru obţinerea şi descifrarea spectrelor RPE

Ioni	J	Numărul componenţilor în spectrul superfin	Condiţiile existenţei spectrelor RPE
$^{55}Mn^{2+}$	5/2	6	Simetrie înaltă a înconjurării sau temperatură scăzută
$^{58}Fe^{2+}$, $^{57}Fe^{2+}$	5/2	6	Temperatură scăzută
$^{59}Co^{2+}$	7/2	8	Temperatură scăzută
Ni^{2+}	7/2	8	Temperatură foarte scăzută
Cu^{2+}	3/2	4	Temperatura camerei
$^{95}Mo^{V}$, $^{97}Mo^{V}$	5/2	6	Temperatura camerei

Compuşii manganului de tip octaedric sau tetraedric dau un spectru care conţine şase picuri. În majoritatea compuşilor de coordinaţie Mn^{2+} cu proteine, structura fină a spectrelor RPE nu poate fi interpretată. În legătură cu asta analiza spectrelor RPE este utilizată numai pentru determinarea gradului de legare al Mn^{2+} conform scăderii intensităţii

spectrului. Totuşi în ultimul timp a fost obţinut un spectru care poate fi bine interpretat în cazul complexului Mn^{2+} cu concanavalina. Spectrele RPE pentru compuşii cu fer , ce au o structură fină , pot fi obţinute numai la temperaturi scăzute (-178^0), cu diferite metaloenzime. Printre aceste enzime sunt câteva reductaze , citocromi şi feredoxime .

Au fost obţinute spectrele RPE pentru compuşi ai Co şi Ni cu o structură simplă (complecşii cu aminoacizi, complecşii cu peptidele cele mai simple, complecşi care conţin O_2 în calitate de ligand etc) .

Cu ajutorul RPE a fost studiat un număr mare de compuşi coordinativi ai cuprului , inclusiv proteinele care conţin cupru şi în special Cu^{2+}- transferină ,Cu^{2+}-carboxipeptidaza, Cu^{2+}-insulină, lacază şi tirosinază, ceruloplasmină, oxidaze etc. Spectrele obţinute indică existenţa unei structuri foarte complexe a înconjurării grupate în jurul Cu(II) cât şi existenţa câtorva cromofori cu Cu(II) în calitate de atom central care diferă ca structură .

În spectrele RPE a xantoxidazei în structura căreia intră Mo, flavinadeninnucleotida şi ferul nehemic sunt trei grupe de benzi : singlet, se referă la FAD-H, cvartet se referă la Mo(V) şi grupa benzilor cu structură greu descifrabilă ce se referă la fer.

V.6.1. Efectele câmpului magnetic asupra stării de spin electronic diferite de zero

În cazul unui sistem cu proprietăţi electronice izotrope şi de spin electronic diferit de zero, efectul unui câmp magnetic se traduce prin hamiltonianul:

$$H_S = g\,\beta\,H\,S_z \qquad (V.10)$$

unde β reprezintă magnetonul Bohr, g este factorul Lande (2,0023 pentru un electron liber), H este câmpul magnetic şi S_z este componenta de spin dealungul axei z (pe care putem să-l definim aici prin câmpul magnetic fără a pierde nici o generalizare întrucât sistemul nostru este izotrop).

Să presupunem că spinul sistemului este S = 1/2. În aceste condiţii operatorul S_z are două valori proprii $M_S = \pm 1/2$ şi două funcţii proprii $|+1/2\rangle$ şi $|-1/2\rangle$. Operatorul H_S va avea deci ca valori proprii $E = \pm(1/2)b\beta H$, iar ca stări proprii cele două stări precedente.

Aceste rezultate sunt prezentate în figura V.3.

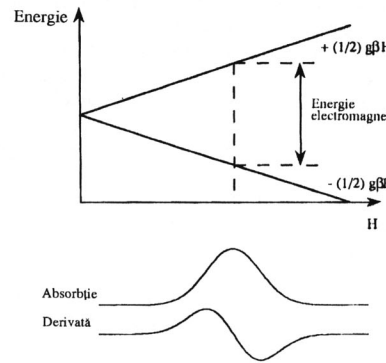


Figura V.3. Rezonanţa unui sistem cu S = 1/2 .

Principiul de bază al metodei RPE este următorul: se trimitre asupra sistemului o undă electromagnetică de energie definită $h\nu_0$ şi se modifică intensitatea câmpului H până ce diferenţa de energie gβH între două nivele succesive să fie $h\nu_0 = g\beta H$.

Atunci avem rezonanţă şi unda electromagnetică este absorbită de sistem pentru a trece de la starea $|-1/2>$ la starea $|+1/2>$. Pentru detectarea acestui fenomen se măsoară absorbţia undei electromegnetice în funcţie de câmpul H. La rezonanţă absorbţia trece printr-un maxim. De fapt se trasează derivata absorbţiei în funcţie de intensitatea câmpului; această derivată se anulează la rezonanţă. Valoarea câmpului rezonant depinde de frecvenţa undei electromagnetice utilizate. Frecvenţa utilizată în aparatele comerciale este de 9,4 Ghz (s-a desemnat această zonă de fercvenţă sun denumirea de "bandă X"). Ea corespunde unei lungimi de undă de 3 cm (deseori se desemnează energia $h\nu_0 = hc/\lambda$ prin cantitatea $1/\lambda = 0{,}33\ cm^{-1}$). Deci un sistem cu factor g = 2 va rezona la H = 3300 G.

Se obişnuieşte identificarea absorbţiilor prin valorile raportului $h\nu_0/\beta H$ mai curând decât prin câmpul rezonant. Acest raport este denumit factor g efectiv (g_{ef}); deci vom avea prin definiţie: $g_{ef} = h\nu_0/\beta H$.

În cazul simplu pe care l-am studiat $g_{ef} = g$, relație independentă de frecvența electromagnetică utilizată. Dacă variația nivelelor în funcție de câmpul magnetic nu mai este liniară, g_{ef} va depinde de frecvența ν_0.

În realitate fenomenele sunt mai complexe decât în cazul izotrop studiat mai sus. O analiză de această complexitate permite obținerea informațiilor utile.

V.6.2. Sisteme anizotrope

Pentru un astfel de sistem hamiltonianul precedent trebuie înlocuit cu $H_S = \beta H[g]S$, unde H este un vector la fel ca și S. [g] este în acest caz un tensor caracteristic sistemului studiat.

Vom discuta în continuare cazul unei simetrii axiale; aceasta vrea să spună că sistemul este astfel conceput că una din axe este distinctă fizic (z) și că axele perpendiculare pe z sunt echivalente. Valoarea principală a tensorului [g] după axa z se notează cu $g_{//}$ iar cea perpendiculară pe z se notează $g_{\perp}$.

Dacă intensitatea câmpului magnetic este paralelă cu z, atunci vom avea hamiltonianul $H_{//} = \beta H g_{//} S_z$. Este clar că valorile proprii ale acestui hamiltonian sunt: $E_{//} = \beta H g_{//} M_S$. Soluția este analoagă cazului izotrop și $g_{ef} = g_{//}$.

În cazul unui câmp magnetic perpendicular pe z vom avea $H_{\perp} = \beta H g_{\perp} S_x$. Căutarea valorilor proprii este mai complicată. Se vor utiliza operatorii $S_+ = S_x + iS_y$ și $S_- = S_x - iS_y$ care sunt astfel că:

$S_+ |+1/2> = 0$ și $S_+ |-1/2> = |+1/2>$

$S_- |+1/2> = |-1/2>$ și $S_- |-1/2> = 0$.

În aceste condiții putem rescrie

$$H_{\perp} = \frac{1}{2}\beta H g_{\perp}(S_+ + S_-) \qquad (V.11)$$

care are ca matrice reprezentativă

$$\begin{pmatrix} 0 & \frac{1}{2}\beta H g_{\perp} \\ \frac{1}{2}\beta H g_{\perp} & 0 \end{pmatrix}$$

şi ale cărui valori proprii sunt: $E_{\perp} = \pm\frac{1}{2}\beta Hg_{\perp}$ ceea ce antrenează $g_{ef} = g_{\perp}$. Pentru un H oarecare este suficient de a determina unghiul θ între câmpul magnetic şi axa z. Este uşor de observat că $g_{ef}^2 = g_{//}^2 \cos^2\theta + g_{\perp}^2 \sin^2\theta$.

Dacă se studiază un monocristal în care axele tuturor moleculelor sunt paralele între ele, vom putea orienta câmpul faţă de axa z a moleculei: vom avea rezonanţă la $g_{//}$. Prin mărirea unghiului θ se va observa că rezonanţa se deplasează în câmp (sau în g) pentru a ajunge la valoarea $g_{\perp}$ pentru $\theta = 90^0$.

În studiul unei pudre omogene sau o soluţie îngheţată (ceea ce este mei frecvent pentru proteine) vor fi realizate toate orientările posibile ale axei z a moleculelor în raport cu câmpul magnetic şi vom avea un spectru numit de "pudră". De exemplu dacă $g_{//} > g_{\perp}$, absorbţia va începe la $g_{//}$ şi va continua până la $g_{\perp}$. Cum din punct de vedere statistic este mai probabil ca o moleculă să aibă axa sa z perpendiculară pe câmpul magnetic decât paralelă, absorbţia va fi mai intensă pentru $g_{//}$. Se obţine atunci spectrul caracteristic unui sistem cu spinul electronic S = 1/2 şi de simetrie axială (figura V.4).

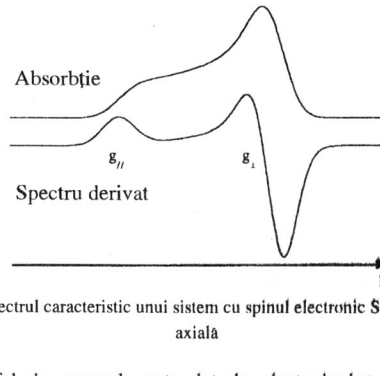


Figura V.4. Spectrul caracteristic unui sistem cu spinul electronic S = 1/2 şi simetrie axială

Un astfel de exemplu este dat de plastocianină o proteină care conţine cupru. În cazul plastocianinei oxidate ionul de cupru este la starea de oxidare +2 şi are configuraţia electronică d^9, deci un singur orbital de tip d conţine un electron neimperecheat. Spinul electronic al plastocianinei

oxidate este deci S = 1/2. În figura V.5 este prezentat spectrul RPE obținut pe această proteină solubilizată.

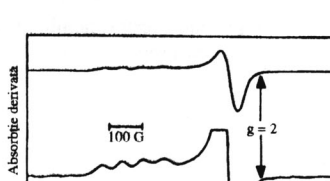


Figura V.5. Spectru RPE al plastocianinei de *Chenopodium album* în banda X la 77 K ($g_{\perp}$ = 2,053 , $g_{//}$ = 2,226 , $A_{\perp} = 17.10^{-4}$ cm^{-1} , $A_{//} = 63.10^{-4}$ cm^{-1}). Semnalul inferior este amplificat pentru a indica rezonanțele datorate cuplajului hiperfin.

Se observă o linie de rezonanță intensă pentru $g_{\perp}$ = 2,053 și mai multe linii de rezonanță care corespund la $g_{//}$ = 2,226.

În stare redusă, cuprul din plastocianină este în sarea de oxidare I cu configurație electronică d^{10}; toți electronii sunt împerecheați, spinul S este egal cu zero și semnalul RPE a dispărut. Se spune că proteina a devenit "tăcută" în RPE. Pe spectrul din partea de jos prezentat în figura V.5 se observă mai bine de rezonanțele multiple corespunzătoare lui $g_{//}$.

V.6.3. Cuplarea hiperfină

Din spectrul prezentat în figura V.5. este clar că teoria precedentă nu este completă. A fost neglijat un fenomen important în RPE: cuplarea între spinul nucleelor (cuprul are un spin nuclear I = 2/3) și spinul electronic. Pentru o orientare dată a spinului electronic sunt posibile mai multe orientări pentru spinul nuclear (în cazul de față patru orientări); cuplarea între acești doi spini are drept consecință că energia sistemului variază ușor după dispunerea relativă a celor doi spini: fiecare nivel electronic se separă în patru nivele și apar patru tranziții diferite.

Această problemă se tratează adăugând hamiltonianului Zeeman un hamiltonian de cuplare între spinul nuclear și spinul electronic (încă denumit cuplarea hiperfină). În cazul unui sistem izotrop vom avea :

$$H_S = g\beta HS_z + aS.I \qquad (V.12)$$

în care a desemnează energia de cuplare hiperfină. Baza de stări în care noi trebuie să căutăm valorile proprii ale acestui hamiltonian este ansamblul vectorilor $|M_S, m_I>$ cu m_I valoarea proprie a lui I_z. Ecuația precedentă poate fi rescrisă astfel:

$$H_S = g\beta HS_z + aS_zI_z + \frac{a}{2}(S_+I_-+S_-I_+) \qquad (V.13)$$

Dacă câmpul magnetic este suficient de puternic termenul al treilea poate fi neglijat și vom avea deci:

$$E = g\beta HM_S + aM_Sm_I \qquad (V.14)$$

Soluțiile sunt reprezentate în figura V.6 pentru cazul I = 3/2.

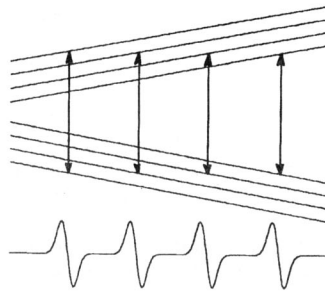


Figura V.6. Nivelele de energie în cazul unui cuplaj între un spin electronic S = 1/2 și un spin nuclear I = 3/2. Sistemul considerat este izotrop.

Tranzițiile RPE cele mai intense corespund unei modificări a lui M_S fără modificarea lui m_I. Pentru m_I există (2I+1) valori posibile. Ar trebui deci să observăm (2I+1) tranziții. Pentru un atom de cupru se observă patru linii. De fapt, în general g și a sunt anizotrope (dar tensorii lor sunt coaxiali). În cazul axial, în câmp paralel, se observă efectul lui $a_{//}$ și în câmp perpendicaular, acela a lui $a_{\perp}$. Pentru plastocianina $a_{//} = 63.10^{-4}$ cm^{-1} și $a_{\perp} = 17.10^{-4}$ cm^{-1}. Valoarea mică a lui a explică de ce efectul său nu este vizibil în figura V.4. pentru un câmp perpendicular. Anizotropia factorului g și energia de cuplare hiperfină se pot lega de anizotropia funcției de undă care caracterizează electronul neîmperecheat al Cu(II) și deci la repartizarea și natura liganzilor Cu(II) în proteina studiată.

V.6.4. Sisteme cu spin electronic mai mare de 1/2

În procesele biologice, în afara Cu(II) intervin şi alţi ioni. Unul din cei mai întâlniţi ioni este Fe(III) al cărui spin (în înconjurare octaedrică în câmp slab de liganzi) este S = 5/2. Un astfel de ion supus unui câmp magnetic va da şase nivele, fiecare caracterizat de o valoare diferită a lui M_S. În figura V.7 sunt reprezentate aceste nivele funcţie de câmpul magnetic.

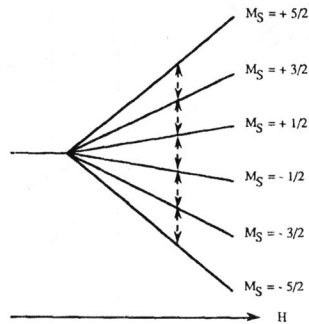


Figura V.7. Scindarea în câmp magnetic a unui ion S = 5/2

Se poate arăta că probabilitatea tranziţiei RPE este maximă când câmpul magnetic este perpendicular pe câmpul magnetic principal în care este plasat eşantionul. Aparatele comerciale sunt constituite asfel ca această condiţie să fie îndeplinită. Dacă se consideră ca axă z axa câmpului, probabilitatea de tranziţie RPE este legată de valoarea medie a operatorilor S_x sau S_y ; deci în calculul unei linii RPE vor interveni operatorii S_+ şi S_-. Rezultă deci că regulile de selecţie RPE sunt $\Delta M_S = \pm 1$. În cazul unui ion de Fe(III) ar trebui să existe cinci tranziţii toate situate la $g_{ef} = g = 2$. În realitate acest lucru nu este absolut exact: se poate demonstra că degenerarea maximă a unei stări în câmp octaedric este patru. Există efecte energetice slabe care ridică degenerarea şase astfel încât chiar în câmp perfect octaedric (O_h) avem schema energetică prezentată în figura V.8. şi spectrul corespunzător.

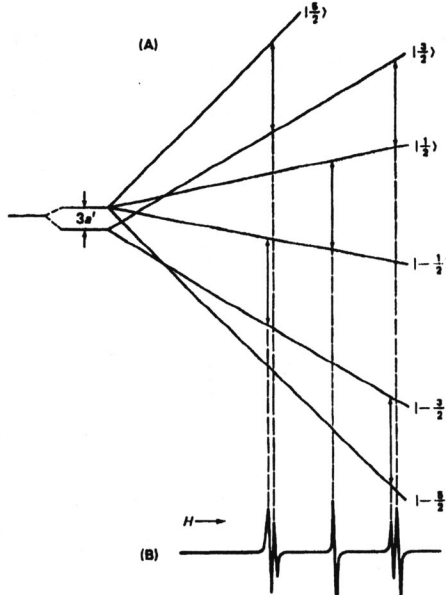


Figura V.8. Nivelele energetice ale unui ion Fe(III) în câmp perfect octaedric (A) şi spectrul RPE corespunzător (B).

Aceste efecte energetice mici (în raport de exemplu cu energia termică la 300 K, 208 cm^{-1}) dar de acelaşi ordin de mărime cu $h\nu_0$ antrenează o modificare spectaculară a spectrului RPE faţă de prevederea noastră simplistă prezentată anterior.

Simetria perfectă O_h este rareori întâlnită. De cele mai multe ori simetria este mai joasă. Pentru o simetrie inferioară celei octaedrice şi în absenţa câmpului magnetic, nivelul electronic al unui Fe(III) cu spinul S = 5/2 se prezintă sub forma a trei dublete (figura V.9.).

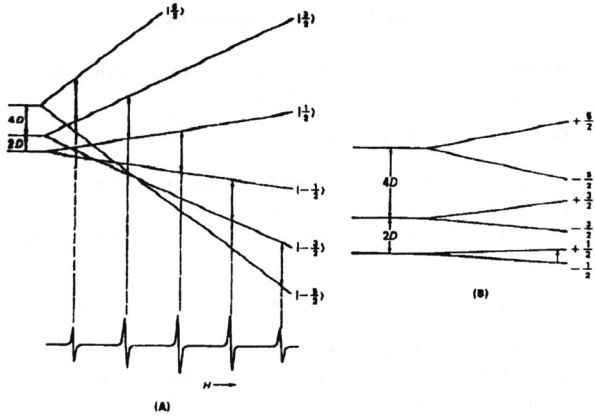


Figura V.9. Nivelele energetice ale unui ion Fe(III) supus unei distorsiuni axiale slabe şi spectrul caracteristic (A); nivelele energetice ale unui ion Fe(III) supus unei distorsiuni axiale puternice (B). Câmpul magnetic este presupus paralel cu axa de distorsiune.

Acest fenomen îl domină pe cel precedent şi este foarte important în RPE: el este denumit "ridicarea degenerării în câmp nul, sau structură fină (în limba engleză *Zero-Field Splitting*).

Acest efect se traduce prin următorul hamiltonian

$$H_S = D\left[S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)\right] + E\left[S_x^2 - S_y^2\right] \qquad (V.15)$$

D şi E sunt parametrii energetici pentru care se pot demonstra că respectă următoarele condiţii:

— simetrie O_h $D = E = 0$
— simetrie axială $D \neq 0, E = 0$
— simetrie oarecare $D \neq 0, E \neq 0.$

Figura V.9 corespunde unui ion Fe(III) în simetrie axială. Dacă separarea energetică între două nivele este mai mică decât cuantumul electromagnetic utilizat, vom avea spectrul prezentat în figura V.9 (A). Dacă distorsiunea este suficient de importantă (B) vom avea un spectru foarte diferit la care vom face referiri în continuare.

V.6.4.1. Cazul unei distorsiuni axiale puternice pentru un ion Fe(III). Spectrul RPE al metmioglobinei

Pentru un ion Fe(III) spin înalt într-un centru puternic distorsionat, dar cu simetrie axială avem următorul hamiltonian :

$$H_S = D\left[S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)\right] + \beta g H.S \qquad (V.16)$$

Axa z este definită de distorsiune. Tensorul g al unui ion F(III) este foarte apropiat de un tensor izotrop g = 2 şi S = 5/2.

Când H este paralel cu axa z, valorile şi vectorii proprii ale lui H_S sunt :

$$E_{//} = D\left[M_S^2 - \frac{1}{3}\frac{5}{2}\left(\frac{5}{2}+1\right)\right] + g\beta H M_S \qquad (V.17)$$

Ele sunt reprezentate în figura V.9 (B) ; în acest caz avem $g_{//} = g = 2$.

Când H este perpendicular cu axa z, s-au găsit următoarele valori şi vectori proprii ale hamiltonianului

$$H_{S\perp} = D\left[S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1) + \beta g H S_x\right] \qquad (V.18)$$

Este convenabilă utilizarea egalităţii $S_x = (S_+ + S_-)/2$ cu :

$$S_+ \mid M_S> = \left[S(S+1) - M_S(M_S+1)\right]^{1/2} \mid M_S + 1>$$

$$S_- \mid M_S> = \left[S(S+1) - M_S(M_S-1)\right]^{1/2} \mid M_S - 1>$$

Se observă că pentru D >> hν, atunci $g_\perp = 3$ g =6.

Aceasta se poate verifica în ferimioglobină (figura V.10)

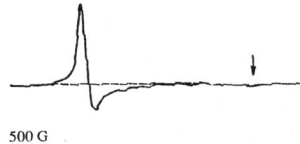


Figura V.10. Spectru RPE al unei soluţii îngheţate de ferimioglobină. Rezonanţa intensă corespunde la $g_\perp = 6$, iar cea slabă (indicată prin săgeată) corespunde la $g_{//} = 2$

S-a studiat un monocristal de metmioglobină pentru diferite orientări ale câmpului magnetic faţă de axa z (figura V.11).

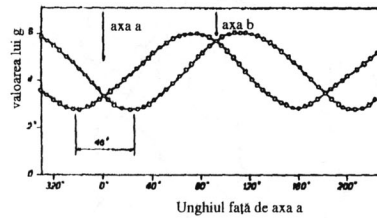


Figura V.11. Variația rezonanțelor RPE ale unui cristal de metmioglobină în funcție de orientarea câmpului magnetic

Această proteină corespunde la dezoxihemoglobina oxidată de un oxidant chimic artificial și nu de dioxigen. Ionul Fe(III) obținut este într-o poziție asemănătoare cu cea a Fe(II) din dezoximioglobina (adică ușor în afara planului). Simetria este apropiată de C_{4v}, deci axială cu axa z perpendiculară pe planul hemului. Se observă că această rezonanță variază între $g_{ef} = 6$ (câmp perpendicular pe z) și o valoare apropiată de 2. Valoarea minimă din figura V.11 nu este strict egală cu 2 pentru că în cazul cristalului studiat acesta era dispus astfel că rotația efectuată nu putea aduce câmpul paralel cu z. S-au obținut două rezonanțe în fiecare punct pentru că celula elementară a cristalului conține două molecule orientate diferit. Se observă că astfel de studii permit obținerea de informații asupra orientării în cristal a planului hemului.

V.6.4.2. Ion de Fe(III) în simetrie rombică

Ionii de Fe(III) pot exista în și în alte înconjurări biologice decât cele porfirinice (de exemplu în hemeritrină). Anumite înconjurări biologice nu mai corespund deloc unei simetrii axiale. Cazul cel mai cunoscut este cel al proteinelor fer - sulf. În continuare vom discuta spectrul RPE pentru proteinele fer - sulf cu un singur atom de fer, care sunt cele mai simple proteine de acest fel.

În figura V.12 este prezentată structura unei astfel de proteine, rubredodixina de *Clostridium pasteurianum.*

Se observă clar că atomul de fer este înconjurat de grupări tiolat provenind de la patru aminoacizi cisteină.

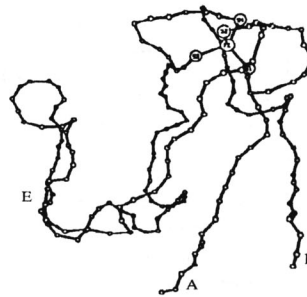


Figura V.12. Structura rubredodixinei de *Clostridium pasteurianum.*

În figura V.13 este prezentat spectrul RPE în funcţie de temperatură al rubredoxinei de *Pseudomonas oleovorans.*

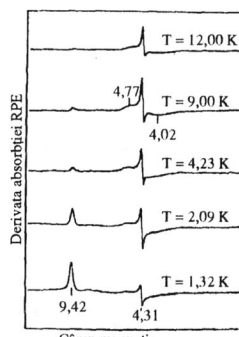


Figura V.13. Spectrul RPE în funcţie de temperatură al rubredoxina de *Pseudomonas oleovorans*

La 12K se observă o rezonanţă unică la g_{ef} = 4,3. La temperaturi mai mici se observă apariţia unor rezonanţe suplimentare. În continuare vom încerca să explicăm originea lor.

Dacă se studiază soluţiile lui H_S :

$$H_S = D\left[S_z^2 - \frac{1}{3}S(S+1)\right] + E\left[S_x^2 - S_y^2\right] + \beta gH.S \qquad (V.19)$$

pentru câmpuri slabe în funcţie de E/D se vor găsi pentru g_{ef} trei dublete cu valorile indicate în figura V.14. Dacă E/D = 0, vom regăsi $g_{ef\perp} = 6$ şi $g_{//} = 2$.

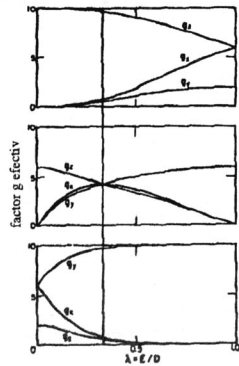


Figura V.14. Variaţia rezonanţelor celor trei dublete ale Fe(III) la câmp slab în funcţie de raportul E/D

Un caz deosebit este observat la E/D = 0,33. Dubletul intermediar are atunci trei rezonanţe cu aceeaşi valoare a lui $g_{ef} = 4,29$. Se va obţine un semnal izotrop a cărui intensitate se va diminua cu scăderea temperaturii pentru că acest semnal provine de la o stare excitată.

Atunci se va observa apariţia rezonanţelor dubletului fundamental. Această situaţie s-a reprezentat în figura V.15 în care sunt prezentate rezonanţele celor trei dublete pentru E/D = 0,33; înconjurământul chimic este cel corespunzător unei situaţii numite "rombice".

Cazul rubredoxinei este foarte apropiat de acest caz rombic, ceea ce explică observaţiile experimentale. Aceste rezultate pot fi foarte exact interpretate considerând E = 0,495 cm^{-1} şi D = 1,76 cm^{-1}, aşa cum se prezintă în figura V.16.

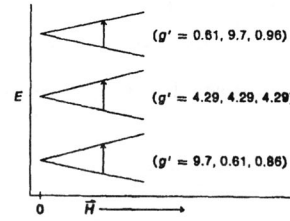


Figura V.15. Rezonanțele celor trei dublete ale unui ion Fe(III) în cazul E/D = 0,33 (simetrie rombică)

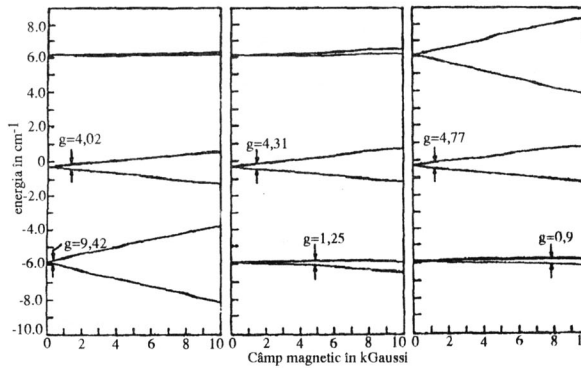


Figura V.16. Nivelele energetice în cazul rubredoxinei.

V.6.4.3. Fe(III) hemic neaxial: citocromul P_{450}

Citocromul P_{450} este o enzimă importantă care catalizează oxidarea substraturilor organice cu dioxigen. Centrul său activ este un hem. Ligandul axial al atomului de fer nu mai este o histidină ca în cazul hemoglobinei ci gruparea laterală tiolat a unei cisteine.

Spectrul RPE la 15 K pentru această enzimă a Fe(III) în prezența camforului ca substrat este prezentat în figura V.17.

Figura V.17. Spectrul RPE la 15 K al *P. putida* P_{450} în prezența camforului.

În jurul lui g = 2 se observă rezonanțele unui Fe(III) spin scăzut (S = 1/2) cu valorile 2,45; 2,26 și 1,91. Rezonanța de la 1,98 nu a putut fi atribuită cu certitudine.

În continuare vom comenta rezonanțele de la 8,0; 4,0 și 1,8. Ele provin de la absorbția de către un ion Fe(III) spin înalt cu simetrie axială imperfectă. În ciuda aparențelor, ele corespund la 60% din eșantion. Valoarea rezonanțelor și variația lor de intensitate cu temperatura s-au interpretat cu D = 3,8 cm^{-1} și E/D = 0,087. Este vorba despre rezonanțele în dubletul Kramers, prezentat în figura V.14(c). Această figură dă pentru E/D = 0,087, g = 7,81; 3,93;1,77 valori considerate în bun acord cu experiența.

Se observă deci că rezonanțele unui Fe(III) într-un hem pot fi modulate de ligandul axial. Citocromul P_{450} este hemul cel mai puțin axial care se cunoaște.

V.7. Rezonanța magnetică nucleară

Rezonanța magnetică nucleară (RMN)se utilizează în studiul diferitelor nuclee atomice în chimia organică și în chimia compușilor coordinativi având o rezoluție foarte mare. O răspândire mare o are RMN a protonului cu toate că în ultimul timp prin această metodă se studiază și nuclee ca ^{31}P, ^{13}C, ^{23}Na. Bazele fizice ale metodei sunt similare cu cele ale metodei RPE. Diferența constă în felul cum este formulată condiția rezonanței, și anume:

$$h\nu = 2\mu H \qquad (V.20)$$

unde H este intensitatea câmpului magnetic, ν este frecvenţa, μ este momentul magnetic în apropierea nucleului.

Pentru unul şi acelaşi nucleu valoarea lui μ poate fi diferită în funcţie de înconjurarea electronică a nucleului şi în primul rând de gradul de completare a orbitalilor cu electroni. Absorbţia energiei electromagnetice se observă la menţinerea condiţiei de rezonanţă (V.20) iar în spectru apare un pic corespunzător la o frecvenţă ce corespunde acestei condiţii.

Deplasarea frecvenţei ν în raport cu picul substanţei standard se numeşte deplasare chimică.

La utilizarea RMN în chimia bioanorganică o importanţă mare o are determinarea influenţei diferitelor particule şi în primul rând a centrilor paramagnetici asupra timpilor de relaxare T_1 şi T_2 a nucleelor excitate (T_1 timpul stingerii excitării pe axa Z în jurul căreia acţionează precesia excitării magnetice a nucleului, T_2 timpul de stingere a excitării perpendicular pe axa z).

Ionii paramagnetici modifică mult timpul de relaxare a diferitelor nuclee şi în primul rând a protonilor.

În experiment se determină τ_c - timpul introducerii dipolului şi τ_ε timpul interacţiunii spin-spin. În acest caz pentru molecula de apă se pot scrie următoarele relaţii :

$$\frac{1}{NT_1} = \frac{6}{15} D_q \tau_c \qquad (V.21)$$

$$\frac{1}{NT_2} = \frac{7}{15} D_q \tau_c - C_q \tau_\varepsilon \qquad (V.22)$$

$$D = \frac{S(S+1)g^2\beta^2\gamma^2}{r^6[H_2O]} \qquad (V.23)$$

$$C = \frac{S(S+1)A^2}{3h^2[H_2O]} \qquad (V.24)$$

unde N este concentraţia molară a ionilor paramagnetici ai metalului, q numărul moleculelor de apă din prima sferă de coordinare, γ factorul giromagnetic nucleic, A constanta interacţiunii superfine şi S numărul cuantic de spin al ionului paramagnetic.

În chimia bioanorganică tehnica este utilizată în cazul ^{23}Na şi ^{43}Ca pentru determinarea stabilităţii compuşilor de coordinaţie corespunzători.

S-a determinat stabilitatea compuşilor de coordinare ai Na^+ cu ARN, din timpul de relaxare cu modificarea pH-ului mediului.

Influenţa ionilor paramagnetici asupra timpului de relaxare al protonilor din apă şi din alte substanţe a fost studiată în cazul metaloenzimelor care conţin ioni de Mn^{2+} şi Co^{2+} (carboxipeptidaze, argininchinază, aldolaze, carboanhidrază etc). De exemplu s-a arătat că în carboxipeptidază care conţine Mn^{2+} timpul de relaxare al moleculei de apă T_1 este 0,049 secunde pe când în hexaaquoionul ionul Mn (II) această valoare este de 1,5 ori mai mare (0,78 secunde).

Relaţia V.23 poate fi utilizată pentru determinarea distanţelor fizice de la ionul paramagnetic până la protonul investigat. Astfel poate fi obţinută o valoare destul de precisă deoarece lărgimea benzii în spectrul RMN depinde de valoarea r^6 de la numitor.

V.7.1. Spectroscopia ENDOR

S-a văzut în paragraful V.6. că spectroscopia RPE permite detectarea interacţiunilor între spinii nucleari şi electronici (cuplare hiperfină).

Spectroscopia ENDOR permite măsurarea directă a cuplării între un spin electronic şi spinul unui nucleu şi permite deasemenea identificarea acestui nucleu. Această spectroscopie este foarte utilă în biochimie pentru identificarea unui atom din apropierea unui centru activ.

Hamiltonianul cel mai simplu care traduce matematic experienţa ENDOR este următorul:

$$H_s = g\beta HS_z + haS_zI_z - g_N\beta_N HI_z \qquad (V.25)$$

scrierea cuplajului hiperfin sub forma ha indică măsurarea cuplării hiperfine în frecvenţă (MHz). Termenul Zeeman nuclear a fost adăugat deoarece aceste experienţe sunt suficient de sensibile pentru a detecta efectele.

Vom face presupunerea că S = I = 1/2. Vectorii proprii ai hamiltonianului precedent sunt indicaţi prin M_S şi m_I. Valorile proprii vor avea expresia

$$E(M_S,m_I) = g\ g\beta HM_S + ha\ M_S,m_I - g_N\beta_N Hm_I \qquad (V.26)$$

Tranziţiile RPE vor corespunde la $\Delta M_S = \pm 1$, $\Delta m_I = 0$. Ele sunt indicate în figura V.18 prin săgeţi punctate.

Experienţa constă în a supune eşantionul la un câmp corespunzând la una din tranziţiile RPE şi la o radiaţie în domeniul de microunde cu intensitate suficientă pentru a depăşi absorbţia RPE.

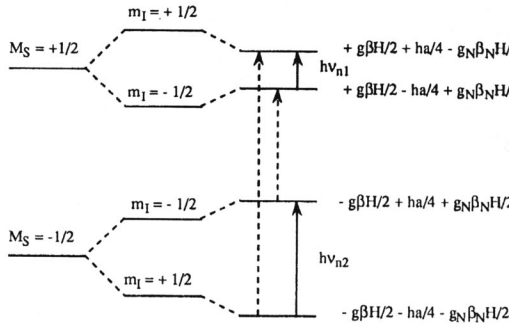


Figura V.18. Tranziţiile RPE (săgeţi punctate) şi ENDOR (săgeţi pline) pentru un sistem S = I = 1/2 cu a > 0

Se adaugă apoi o radiaţie în domeniul undelor radio (Mhz). Energia acestei radiofrecvenţe variază continuu. Dacă această energie este egală cu energiile tranziţiilor $h\nu_{n1}$ sau $h\nu_{n2}$, nivelele sunt perturbate de reapariţia tranziţiei RPE. Se obţine un spectru care conţine două picuri (figura V.19)

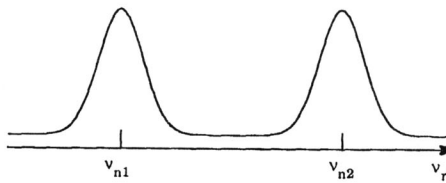


Figura V.19. Scindarea picului RPE în cazul în care radiaţia de radiofrecvenţă este egală cu una din energiile de tranziţie $h\nu_{n1}$ şi $h\nu_{n2}$.

După valorile proprii de mai jos, se găseşte, punând condiţia:

$h\nu_o = g_N\beta_N H$: (V.27)

$\nu_{n1} = |a/2 - \nu_o|$

$\nu_{n2} = |a/2 + \nu_o|$

Dacă $|a/2| > 0$ picurile sunt de o parte şi de alta a lui $|a/2|$ şi distanţa între ele este de $2\nu_o$. Dacă $|a/2| < 0$ picurile sunt de o parte şi de alta a lui ν_o şi distanţate între ele cu $|a|$.

Frecvenţa ν_o de rezonanţă nucleară este o caracteristică a nucleului. Energia de cuplare hiperfină ha este legată de poziţia nucleului în raport cu centrul care posedă spin electronic. Se înţelege astfel de ce obţinem un mare număr de informaţii.

Pentru calculul lui ν_o se utilizează relaţia: $g_N\beta_N = \gamma_N h/2\pi$, de unde $\nu_o = \gamma_N H/2\pi$. γ_N are valorile următoare pentru nucleele: $^1H(I = 1/2)$ $\gamma_N = 2{,}67510.10^4$ rad.G^{-1}; $^2H(I = 1)$ $\gamma_N = 0{,}41064.10^4$ rad.G^{-1}, $^{17}O(I = 1/2)$ $\gamma_N = -0{,}36266.10^4$ rad.G^{-1}.

Studiul citocromului c peroxidazei (CcP) efectuat de echipa condusă de Brian Hoffman (Northwestern University, Evanston, Illinois, SUA) reprezintă un exemplu excelent. Este vorba despre sistemele hemice care catalizează oxidarea cu apă oxigenată a diferitelor tipuri de substraturi. În cazul CcP substratul este citocromul c . Peroxidazele stochează cei doi echivalenţi oxidanţi de H_2O_2 în două puncte diferite, unul pe atomul de fer, celălalt pe un constituent organic. Hoffman şi colaboratorii au pus în evidenţă că este vorba de triptofan 191; gruparea laterală a triptofanului (Trp) este:

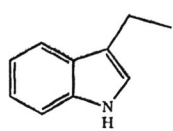


Figura V.20. Structura laterală a triptofanului.

Spectrul ENDOR ^1H al CcP într-un câmp de 12512 G este prezentat în figura V.21.

În spectrul (A) se observă mai multe dublete de o parte şi de alta a frecvenţei lui Larmor a ^1H cu frecvenţele cuplării hiperfine variind de la 3 la 20 MHz. Se observă un pic care se află exact la frecvenţa Larmor a ^1H: este vorba de protonul "depărtat" care este cuplat la tranziţia RPE printr-un alt mecanism decât cuplarea hiperfină.

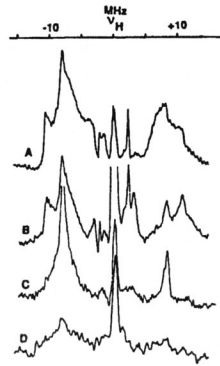


Figura V.21. Spectrul ENDOR ^1H la $g_\perp = 2{,}01$ pentru ansamblul CcP + substrat.

Spectrul (B) este caracteristic unui CcP a unui mutant în care Trp 51 a fost înlocuit de o fenil alanină (doi Trp se găsesc în apropierea hemului, cei denumiţi 51 şi 191). Spectrul (B) diferă foarte puţin de spectrul (A). Spectrul (C) este caracteristic unui CcP în care toţi Trp-ii au fost deuteraţi. În acest caz rămâne numai semnalul protonului îndepărtat şi al protonului din Trp care poate fi schimbat cu H_2O. Spectrul de (D) corespunde CcP-ului din spectrul (C) dar în D_2O. În acest caz nu se mai observă decât semnalul protonului îndepărtat. Radicalul este deci Trp 191.

V.7.1.1. Sistemele cuplate

Până acum am discutat câteva tipuri de comportament ale metaloenzimelor în RPE. De fapt noi ne-am concentrat numai asupra centrilor monometalici. Numeroase metaloenzime au centri activi care conţin mai mulţi ioni metalici, care sunt încă puţin caracterizaţi din punct de vedere structural şi funcţional.

În mod curios metmeritrina care posedă doi ioni Fe(III) aflaţi în înconjurări în care ar trebui să fie spin înalt este "tăcută" în RPE. Contrar aşteptărilor semi-metmeritrina (care conţine o pereche Fe(II)Fe(III)) dă semnalul anizotrop din figura V.21., care poate să fie analizat ca provenind de la o stare de spin S = 1/2.

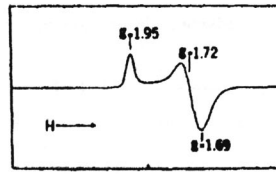


Figura V.21. Spectrul RPE al semi-metmeritrinei.

Absența semnalului în forma Fe(III)Fe(III) este cu adevărat surprinzătoare. Explicația este totuși cunoscută și-și are originea în structura dinucleară a centrului. De fapt în acest centru, doi ioni cu spinul $S_A = S_B = 5/2$ sunt apropiați unul de altul. Se știe că în fizica cuantică un astfel de sistem va avea un spin total $S = S_A + S_B$ ale căror valori posibile trebuie să respecte condiția $|S_A - S_B| \leq S \leq S_A + S_B$ care aici revine la $0 \leq S \leq 5$. Diferitele stări ale perechii sunt în general de energii diferite care depin de modul de cuplare ale acestor două momente unghiulare de spin S_A și S_B.

Cel mai frecvent mod de cuplare corespunde hamiltonianului: $H = -JS_A.S_B$ cunoscut în fizică sub denumirea de hamiltonianul lui Heisenberg. În fizica solidului acest hamiltonian se află la baza explicării proprietăților magnetice ale materialelor. Dacă J este negativ cei doi spini au dispunerea cea mai stabilă, adică aceea în care ei sunt orientați antiparalel și se vorbește de cuplarea antiferomagnetică. Dacă J este pozitiv spinii au tendința să se orienteze paralel unul față de altul, fiind vorba de cuplarea feromagnetică.

Pentru un sistem de doi spini, valorile și vectorii proprii ai hamiltonianului precedent sunt ușor de găsit. Rescriind hamiltonianul sub forma:

$$H = -\frac{1}{2}J\left[S^2 - S_A^2 - S_B^2\right] \qquad (V.28)$$

se observă că el comută cu S^2 și în consecință putem găsi simultan vectorii proprii pentru H și S^2. Anterior s-au prezentat valorile posibile pentru S. În baza de funcții proprii a lui S^2, H este diagonal și valorile sale proprii sunt:

$$E = -\frac{1}{2}J\left[S(S+1) - 2\times\frac{5}{2}\times\left(\frac{5}{2}+1\right)\right] \qquad (V.29)$$

Pentru cazul J < 0 nivelele de energie obţinute sunt următoarele (figura V.22):

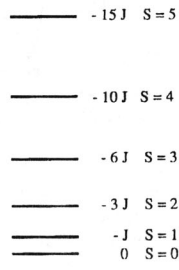


Figura V.22. Nivelele de energie pentru metmeritrină în cazul J < 0.

În cazul nostru J este de ordinul a -200 cm^{-1} . este deci clar că starea de spin S = 0 este practic singura populată în condiţiile experimentale. această stare nu mai prezintă nici o proprietate magnetică, ceea ce explică "tăcerea" în RPE: spinii celor doi ioni Fe(III) se anulează unul pe altul.

Din contră în semi-metmeritrină consecinţele interacţiunii spin-spin sunt diferite. Ionul Fe(III) are un spin $S_A = 5/2$, în timp ce ionul Fe(II) are un spin $S_B = 2$. Spinii sunt diferiţi şi chiar când sunt antiparaleli ei nu se pot compensa: vom avea $1/2 \leq S \leq 9/2$ şi ordinea nivelelor energetice prezentată în figura V.23.

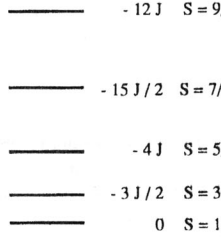


Figura V.23. Ordinea nivelelor de energie în semi-metmeritrină.

Un astfel de cuplaj este numit cuplaj ferimagnetic. În acest caz nivelul fundamental este magnetic şi cu spinul S = 1/2. Un fenomen analog se află la originea proprietăţilor de magnetizare al magnetitei Fe_3O_4 compus din ioni Fe(II) şi Fe(III). O diferenţă fundamentală faţă de semimetmeritrină este aceea că în magnetită interacţia nu este restrâsă la doi spini, ci are loc la nivelul întregului cristal.

Aceste fenomene sunt des întâlnite în metaloenzime.

V.8. Spectroscopia de rezonanţă cu raze γ

Această metodă a fost utilizată practic în bioanorganică numai pentru complecşii care conţin ioni de fer. Absorbţia razelor γ descoperită de Mössbauer decurge prin menţinerea riguroasă a condiţiilor de rezonanţă, astfel la descompunerea nucleului de ^{57}Co se formează nuclee de ^{57}Fe care sunt capabile să absoarbă raze γ cu energia 14,41 KeV. Această energie depinde de înconjurarea ionului de fer şi diferă de cea pentru ferul metalic cu o valoare oarecare care poartă denumirea de *deplasare izomeră*. Pentru compensarea diferenţei de energie dintre atomul de fer excitat şi atomul de fer în stare fundamentală, din diferite substanţe chimice se utilizează efectul Döppler, care constă în deplasarea probei studiate spre sursa de energie (sau invers) cu o anumită viteză exprimată în nm/s. Modificarea vitezei de deplasare cu un nm/s corespunde modificării valorii deplasării izomere cu $4{,}9.10^{-8}$ eV.

Nucleul atomului de fer în stare excitată se caracterizează prin J=3/2 şi deci poate exista în două stări (J=3/2 şi J=1/2). Existenţa acestor stări duce la apariţia aşa-numitor scindări de quadrupol în spectrele de absorbţie cu raze γ. Mărimea scindării de quadrupol depinde de starea de spin şi de simetria înconjurării atomului de fer.

Spectroscopia de rezonanţă cu raze γ a fost utilizată la studiul *feredoxinei* şi *hemeritrinei*. În acest caz a fost observată o diferenţă destul de mare între spectrele speciilor oxidate şi reduse ale ferului.

V.9. Spectroscopia EXAFS

Spre deosebire de metodele prezentate anterior această metodă nefiind fondată pe fenomenul de difracţie al razelor X de o reţea periodică, nu mai necesită cristale şi deci poate fi aplicată soluţiilor. Această metodă

este fondată pe analiza detaliată a absorbţiei razelor X de un atom. acest fenomen este prezentat în figura V.24.

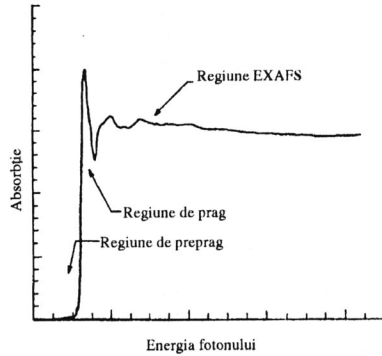


Figura V.24. Absorbţia razelor X de către un atom.

În funcţie de energia razelor X se disting trei zone: zona de preprag, pragul şi zona EXAFS. Prima zonă corespunde tranziţiilor electronilor din straturile K spre straturile superioare; a doua zonă corespunde zonei limită unde energia razelor X devine suficientă pentru ionizarea atomului; ultima zonă (care nu există decât în cazul în care atomul cu a cărui prag de ionizare lucrăm are vecini) este un fenomen de interferenţă între unda asociată electronului emis şi reflexiile sale asupra vecinilor. În mod intuitiv se înţelege că analiza acestor interferenţe poate da informaţii asupra geometriei de organizare a atomilor vecini cu atomul emitent.

Această metoda are o aplicaţie foarte generală. Este în mod particular bine adaptată la studierea înconjurământului atomilor metalici în metaloenzime.

În continuare vom prezenta un exemplu interesant. În figura V.25. este prezentată structura rubredoxinei de *Clostridium Pasteurianum.* Prin studiul radiocristalografic s-au identificat trei distanţe Fe-S = 2,30 Å şi una mai scurtă de 2,05 Å. Din contră prin studiul EXAFS s-a găsit o singură distanţă Fe-S = 2,27 Å. Un nou studiu radiocristalografic a confirmat rezultatele EXAFS şi a suprimat erorile primelor studii.

Diferitele etape ale studiului EXAFS sunt prezentate în figura V.25. După înregistrarea absorbției razelor X în funcție de energia lor (sau a vectorului lor de undă) se scade fondul continuu de absorbție. Se obține o curbă de tipul V.25(a) în care interferențele EXAFS sunt evidente. După un tratament matematic simplu care amplifică oscilațiile EXAFS (figura V.25(b)) se face o transformată Fourier care dă un spectru în spațiu direct de distanțe (cu un decalaj de ordinul 0,2 până la 0,5 Å care depinde de elementul studiat, dar acest decalaj poate fi etalonat folosind compuși cu structură cunoscută) (figura V.25(c)). Putem avea deja o idee despre distanțele interatomice. Următoarea etapă constă în prelucrarea descrierii înconjurământului atomului studiat simulând cu transformata Fourier a porțiunilor din curba V.25(c) cu ajutorul modelelor teoretice care permit considerarea naturii vecinilor, distanței lor în raport cu atomul emitent, precum și numărul lor.

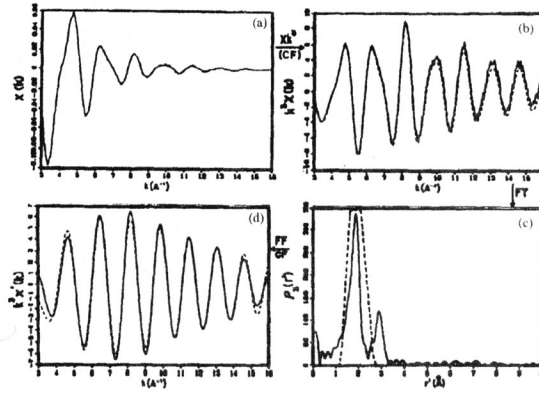


Figura V.25. Etapele analizei datelor în spectroscopia EXAFS.

În figura V.26 sunt prezentate rezultatele EXAFS obținute prin analiza diferitelor tipuri de proteine Fe-S.

În cazul spectrului rubredoxinelor (figura V.26(a))în spațiul direct se observă clar picul corespunzător distanței Fe-S = 2,27 Å.

În cazul proteinelor cu doi atomi de fer (figura V.26(b))se observă pe același tip de spectru distanțele Fe-S = 2,27 Å și Fe-Fe = 2,7 Å; aceleași observații sunt valabile și pentru proteinele cu patru atomi de fer în moleculă (figura V.26(C)).

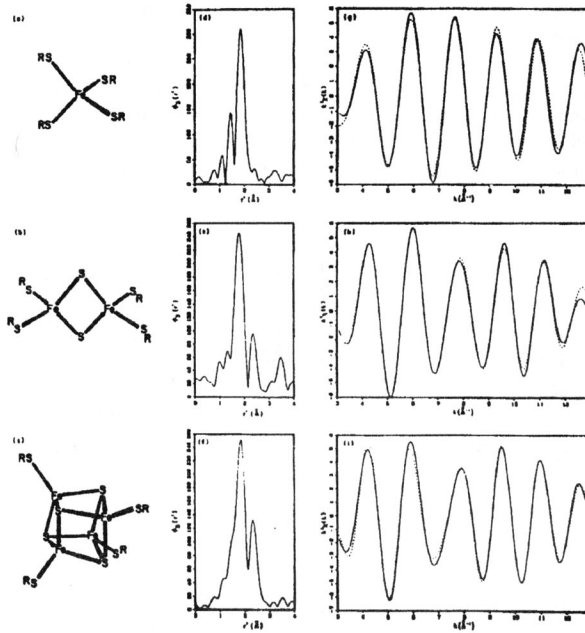


Figura V.26. Studiul EXAFS al centrilor activi pentru unele proteine Fe-S ce conțin unu, doi și trei atomi de fer.

V.10. Determinarea structurii folosind sonde spectrale

În chimia bioanorganică uneori este dificil să se obțină date spectrale pentru că atomii sau moleculele sistemului studiat prezintă în

mică proporție sau deloc proprietăți spectrale. O modalitate de depășire a acestei dificultăți este utilizarea sondelor spectrale adică a unor atomi sau ioni cu proprietăți spectrale binecunoscute și ușor de măsurat. În procedeul numit de marcare (izotopi) sau de dopare, anumiți atomi sau ioni ai sistemului studiat sunt înlocuiți de alți izotopi sau alți ioni.

Marcajul izotopic este mai ales utilizat pentru o tratare a problemei prin metode radiochimice, prin RMN, RPE sau spectroscopii vibraționale sau nucleare (Mösbauer, RQN).

Dopajul cu ioni ai metalelor tranziționale este practicat în cazul în care se dorește măsurarea spectrelor optice (absorbție, emisie, dicroism circular) sau RPE. Alegerea ionului va depinde de sistemul studiat și de tehnica de investigare aleasă. Printre ionii cel mai des utilizați sunt ionii trivalenți ai lantanidelor (Z = 57÷71) care au proprietatea de a prezenta spectre electronice de absorbție sau emisie asemănătoare cu spectrele atomice, deci ușor de identificat. Ionii Tb(III) și Eu(III) sunt foarte indicați pentru a rezolva următoarele probleme:

— determinarea simetriei unui centru într-o rețea cristalină;

— determinarea înconjurământului unui centru activ într-o enzimă;

— determinarea distanței între doi centri de coordinare;

— analiza structurală a moleculelor complexe prin metoda reactivilor de deplasare chimică (RMN). Această metodă utilizează proprietățile magnetice ale ionilor Ln(III).

Introducerea unui trasor sau a unei sonde spectrale într-un sistem modifică aproape întotdeauna proprietățile acestui sistem și ca urmare rezultatele obținute vor fi utilizate cu prudență.

V.10.1 Utilizarea ionului Eu(III)

În continuare se va prezenta utilizarea ionului Eu(III) ca sondă spectrală pentru determinarea structurii. Acest ion, a cărui stare fundamentală este $^7F_0$, prezintă mai multe stări excitate care conduc la o fluorescență, mai ales $^5D_0$ și $^5D_1$ (figura V.27). În acest caz se observă două tipuri de tranziții:

— cu caracter dipolar electric; sunt tranziții interzise în principiu (tranziții interne f-f) de regulile de selecție, dar care se observă totuși cu o intensitate redusă;

— cu caracter dipolar magnetic; sunt tranziții permise în principiu, dar au o intensitate foarte scăzută.

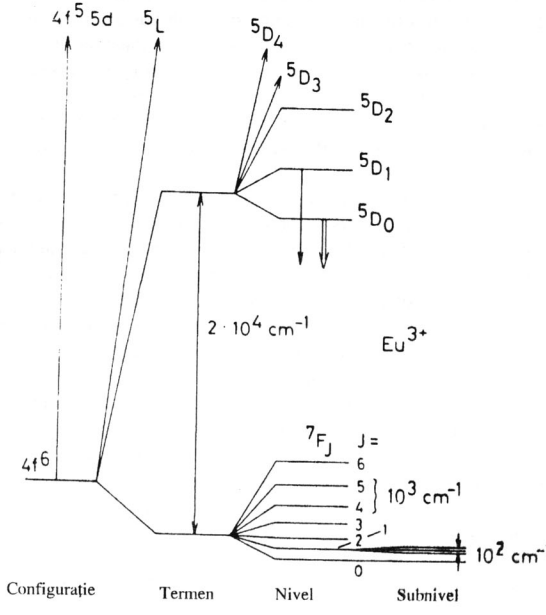


Figura V.27. Starea fundamentală și stările excitate în ionul Eu(III).

În plus față de selecția spectrală invocată mai sus, tranzițiile între subnivelele datorate câmpului cristalin sunt strict guvernate de regulile de simetrie. Condiția de tranziție între două subnivele n și m este :

$$\langle \psi_n | O_p | \psi_m \rangle \neq 0 ,$$

ceea ce implică că produsul direct al reprezentărilor ireductibile la care aparțin Ψ_n și Ψ_m trebuie să conțină reprezentarea Γ_{op} a operatorului dipolar (electric sau magnetic).

Examinarea detaliată a spectrului de emisie $^5D_0 \rightarrow {}^7F_j$ va ține cont de următoarele elemente:

— numărul şi reprezentările ireductibile ale subnivelelor create de influienţa câmpului cristalin;

— numărul şi natura tranziţiilor permise între aceste subnivele.

În tabelul V.7 sunt prezentate numărul subnivelelor care apar în câmpul cristalin.

Tabelul V.7. Numărul de subnivele care apar în diferite câmpuri cristaline

Simetrie	J : 0	1	2	3	4	5	6
Icosaedrică	1	1	1	2	2	3	4
Cubică[1]	1	1	2	3	4	4	6
Hexagonală[2]	1	2	3	5	6	7	9
Pentagonală[3]	1	2	3	4	5	7	8
Tetragonală[4]	1	2	4	5	7	8	10
Joasă[5]	1	3	5	7	9	11	13

1 : O_h, O, T_d, T_h, T ; 3 : D_{5h}, C_{5h}, C_{5v}, C_5, D_5 ;

2 : D_{6h}, D_6, C_{6v}, C_{6h}, C_6, D_{3h}, C_{3h}, D_{3d}, D_3, C_{3v}, S_6, C_3 ; 4 : D_{4h}, D_4, C_{4v}, C_{4h}, C_4, D_{2d}, S_4 ;

5 : D_{2h}, D_2, C_{2v}, C_{2h}, C_2, S_2, C_1

Astfel, dacă Eu(III) se află într-un centru de simetrie O_h se pot determina cu uşurinţă care vor fi tranziţiile observabile:

$^5D_0$ şi $^7F_0$ se transformă ca şi A_{1g} (un subnivel)
$^5D_1$ şi $^7F_1$ se transformă ca şi T_{1g} (un subnivel)
$^5D_2$ şi $^7F_2$ se transformă ca şi E_g+T_{2g} (două subnivele)
$^5D_3$ şi $^7F_3$ se transformă ca şi $A_{2g}+T_{1g}+T_{2g}$ (trei subnivele)
operatorul dipolar electric se transformă ca (x,y,z), adică T_{1u}
operatorul dipolar magnetic se transformă ca (R_x, R_y, R_z), adică T_{1g}.

Numărul maxim de centre de coordinare diferite din compusul examinat va fi dat de numărul de componente ale tranziţiei $^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ (J = 0, deci nu există ridicarea degenerării datorată câmpului cristalin).

Analizând tabelul V.8 unde sunt prezentate produsele directe pentru câteva tranziţii $^5D_J \rightarrow {}^7F_J$, se observă că nici una nu conţine pe T_{1u} şi ca urmare toate tranziţiile cu caracter electric dipolar vor fi interzise. Tranziţiile cu caracter magnetic dipolar sunt prezentate în tabelul V.8.

Tabelul V.8. Produsul direct şi tranziţiile dipolare magnetice permise pentru unele tranziţii $^5D_J \rightarrow {}^7F_J$.

$^5D_J \rightarrow {}^7F_J$	Produs direct	Tranziţii dipolare magnetice permise	
$0 \rightarrow 0$	$A_{1g} x A_{1g} = A_{1g}$	niciuna	0
$0 \rightarrow 1$	$A_{1g} x T_{1g} = T_{1g}$	$A_{1g} \rightarrow T_{1g}$	1
$0 \rightarrow 2$	$A_{1g} x (E_g + T_{2g}) = E_g + T_{2g}$	niciuna	0
$1 \rightarrow 0$	$T_{1g} x A_{1g} = T_{1g}$	$T_{1g} \rightarrow A_{1g}$	1
$1 \rightarrow 1$	$T_{1g} x T_{1g} = A_{1g} + E_g + T_{1g} + T_{2g}$	$T_{1g} \rightarrow T_{1g}$	1
$1 \rightarrow 2$	$T_{1g} x (E_g + T_{2g}) = T_{1g} + T_{2g} +$ $A_{2g} + E_g + T_{1g} + T_{2g}$	$T_{1g} \rightarrow E_g$ $T_{1g} \rightarrow T_{2g}$	2
$2 \rightarrow 3$	$(E_g + T_{2g}) x (A_{2g} + T_{1g} + T_{2g} T_{2g}) = E_g +$ $T_{1g} + T_{2g} + T_{1g} + T_{2g} + T_{1g} + A_{2g} +$ $E_g + T_{1g} + T_{2g} + A_{1g} + E_g + T_{1g} + T_{2g}$	$E_g \rightarrow T_{1g}$ $E_g \rightarrow T_{2g}$ $T_{2g} \rightarrow A_{2g}$ $T_{2g} \rightarrow T_{1g}$ $T_{2g} \rightarrow T_{1g}$	5

Aceste reguli sunt valabile cu condiţia ca tranziţiile să fie pur electronice. Anumite mecanisme mai complexe, vibronice, cooperative etc. pot relaxa unele din aceste reguli.

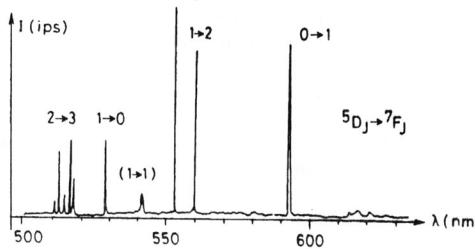


Figura V.28. Spectrul de emisie la 77 K a Cs_2NaYCl_6:Eu (1% Eu).

În figura V.28 este prezentat spectrul Cs_2NaYCl_6:Eu (1% din atomii Y au fost înlocuiţi de Eu(III). Din acest spectru se observă foarte clar numărul tranziţiilor prezise, ceea ce permite să se tragă concluzia că Eu(III) este plasat într-un centru octaedric.

După cum se vede nu toţi cationii din compuşii coordinativi cu activitate biologică pot fi detectaţi şi caracterizaţi cu ajutorul metodelor fizice. Cele mai dificile sunt investigările compuşilor de coordinaţie ai metalelor netranziţionale. De aceea în bioanorganică o largă răspândire o are metoda aşa-numitelor probe ionice, care constă în substituirea, în biocomplecşi, a ionilor greu de determinat cu ioni care pot fi determinaţi mai uşor.

Tabelul V.9. Ioni-substituenţi în biocomplecşi

Ionul iniţial (nativ)	Razele şi numerele de coordinare		Ioni substituenţi	Razele şi numerele de coordinare		Metodele de detectare a ionilor substituenţi
K^+	1,33	6,8	NH_4^+, Cu^+,	1,43		- Spectrele de vibraţie
			Co^+,	1,65	8	- chimice
			Tl^+	1,49	8	- RMN
Mg^{2+}	0,78	6	Mn^{2+},	0,91	6	- RPE paramagentism
			Ni^{2+}	0,78	6	- spectre d-d
Ca^{2+}	1,06	6,8	Mn^{2+},	0,91		- RPE paramagnetism
			Eu^{2+},	1,12		- paramagnetism GRC
			Lu^{2+}	1,0-1,2		- paramagnetism - fluorescenţă
Fe^{3+}	0,63	6	Lu^{3+}	0,93-1		- paramagnetism - fluorescenţă
Zn^{2+}	0,83	4,6	Co^{2+}	0,82	4, 6	- spetre d-d

Pentru o astfel de substituire este necesar să respectăm câteva condiţii:

— dimensiunile ionilor substituiţi şi ai celor care substituie trebuie să fie apropiate (razele lor ionice);

— substituirea să fie izomorfă;

— numerele de coordinare ale ionilor substituiţi şi ale celor care îi substituie trebuie să fie egale;

— structura nivelelor energetice exterioare trebuie să fie cât mai asemănătoare şi capacitatea de a coordina unii şi aceeaşi atomi donori cât mai apropiată.

În tabelul V.9 sunt prezentaţi cationii nativi şi ionii substituenţi care pot fi detectaţi cu ajutorul metodelor fizice.

FUNCŢIILE BIOLOGICE ALE BIOELEMENTELOR

Mecanismele acţiunii biologice a ionilor metalici alcalini şi alcalino-pământoşi nu sunt pe deplin clarificate până în prezent şi în literatură continuă să apară multe lucrări referitoare la această problemă.

Unul dintre cele mai importante aspecte din acest domeniu se referă la repartiţia ionilor de Na^+ şi K^+ între spaţiul intracelular şi extracelular. Se observă practic un exces de ioni de sodiu în spaţiul extracelular şi de ioni de potasiu în cel intracelular. O astfel de repartiţie ireversibilă poate să se menţină numai datorită utilizării stricte a unor mecanisme de reglare.

Cea mai acceptată explicaţie pentru acest fenomen care se mai numeşte *pompa de sodiu* este următoarea: există o fosfatoproteină (gruparea care conţine fosfor este legată cu serina) care formează un compus mai stabil cu ionii de K^+ decât cu ionii de Na^+. Acest compus (K-fosfatoproteina) trece prin membrana biologică în interiorul celulei şi aici eliberează ionul de potasiu datorită fosforilării ei în timpul reacţiei cu ATP-ul.

$$K^+P + ATP \rightarrow P + P + ADP + K^+$$

Fosfatoproteina fosforilată (PP) leagă ionii de Na^+ şi îi transferă prin membrana biologică în exterior. Procesele care au loc în acest caz sunt ilustrate schematic în figura VI.1.

Acţiunea „pompei" este inhibată de unele medicamente cardiovasculare cum ar fi glicozidele cardiace.

Ionii de Na^+ şi K^+ sunt responsabili pentru transmiterea impulsurilor nervoase.

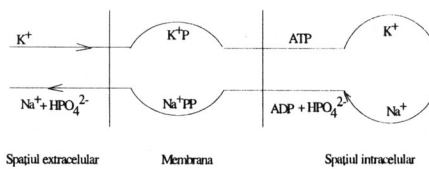


Figura VI.1. Transportul ionilor de K^+ şi Na^+ prin membrana biologică.

Calciul şi magneziul intră în componenţa multor structuri şi participă activ la formarea pereţilor celulari. Aceşti ioni leagă unităţile structurale prin grupările carbonil.

Este interesant că unele specii de bacterii mor în prezenţa EDTA-ului datorită "solvirii" peretului celular în timpul formării compuşilor de coordinaţie solubili de tip $[MeEDTA]^{2-}$.

S-a stabilit cu certitudine faptul că ionii de Mg^{2+} leagă între ei câteva subunităţi ribozomice. Mărirea raportului concentraţiilor cK^+/cMg^{2+} duce la descompunerea ribozomilor mari până la subunităţi şi la modificarea structurii acizilor ribonucleici corespunzători, care sunt situaţi pe ribozomi.

Ionii de Ca^{2+} joacă un rol special în procesele de contracţie şi relaxare musculară. În acest caz ionii de Ca^{2+} reacţionează cu proteinele musculare *actina* şi *miosina*.

În biocompuşii de coordinaţie, ionii de fer, leagă oxigenul molecular şi au funcţie de stocare şi transport a oxigenului necesar pentru realizarea multor procese biochimice cu degajare de energie şi pentru sinteza unor substanţe din organismul viu.

Biocompuşii de coordinaţie ai cuprului şi vanadiului pot forma compuşi de coordinaţie cu oxigenul molecular (dioxigenul).

VI.1. Structura moleculară a dioxigenului

Oxigenul reprezintă unul din cazurile cele mai curioase din ştiinţă. Deşi este unul din elementele cele mai abundente din natură, indispensabil vieţii aerobe, descoperit încă din 1775, independent de Scheele şi Priestley, doar în ultimii 10-15 ani s-a realizat faptul că oxigenul este incomplet cunoscut, mai ales din punct de vedere al proprietăţilor biologice, iar vechile teorii despre peroxidarea substratului biologic şi organic au trebuit reconsiderate.

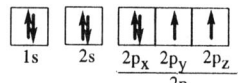
Reacţiile dioxigenului cu substanţele organice, deşi sunt exoterme, nu se produc cu viteze sesizabile la temperaturi obişnuite. Reactivitatea dioxigenului este mult mai mică decât ne-am aştepta la o analiză superficială, iar proprietăţile lui paramagnetice sunt neobişnuite pentru un gaz. Deci, pe de o parte o reactivitate mică în anumite limite a dioxigenului în stare de gaz, iar pe de altă parte o reactivitate mare faţă de metale, materiale plastice şi alte macromolecule, mergând până la toxicitate faţă de organismele vii. Răspunsul la această *situaţie* aparent *paradoxală* a fost dat

prin cercetări ştiinţifice teoretice şi experimentale, care au arătat că dioxigenul poate acţiona rapid în anumite condiţii numai printr-o activare specifică. Această activare se realizează prin specii reactive care provin atât de la oxigenul atomic cât şi de la cel molecular. Speciile reactive posedă toate caracteristicile unor radicali liberi, deşi chiar oxigenul molecular este considerat ca un diradical liber.

De aceea, pentru înţelegerea procesului activării dioxigenului, a capacităţii de peroxidare, a rolului variat şi complex, deosebit de important asupra organismelor vii şi a unor compuşi chimici sau produse industriale, este necesară înţelegerea structurii electronice a atomului şi a moleculei de dioxigen.

Configuraţia straturilor de electroni ale oxigenului atomic prezintă de asemenea particularităţi deosebite. Cei 6 electroni periferici sunt dispuşi conform formulei generale $1s^2 2s^2 2p^4$ şi a schemei din figura VI.2.

a.



b.

Specia	Orbitali degeneraţi de tip 2p			Electroni neîmperecheaţi
	2px	2py	2pz	
O	↿⇂	↑	↑	2
O^-	↿⇂	↿⇂	↑	1
O^{2-}	↿⇂	↿⇂	↿⇂	0

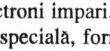
Figura VI.2 : a. Configuraţia electronică a atomului de oxigen.
b. Orbitalii atomici aparţinând ionilor de oxigen (electron p).

Conform calculelor mecanic cuantice, un orbital este complet ocupat când conţine 2 electroni, iar spinii lor sunt opuşi (antiparaleli). În stratul 2p există 2 orbitali ($2p_y$ şi $2p_z$) incomplet ocupaţi cu electroni; ei au aceeaşi stabilitate, conţin câte 1 electron pe orbital şi au acelaşi tip de spin.

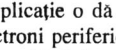
Dacă un orbital conține numai un electron (impar), spinul său va conferi paramagnetism datorită momentului său magnetic. Tendința puternică de împerechere a electronilor din orbitali conferă o mare reactivitate, observată la specia O^- și la radicalul hidroxil HO•.

Configurația electronică a atomului de oxigen explică instabilitatea acestuia și necesitatea existenței în condiții obișnuite a dioxigenului molecular. Dar și molecula de dioxigen prezintă particularități deosebite.

Privită prin prisma Teoriei Legăturii de Valență, structura moleculei de dioxigen s-a dovedit a nu fi compatibilă nici cu existența unei legături duble între atomi, :Ö=Ö:, nici cu prezența unei legături covalente simple de tip σ ca :



Primul caz (O = O) deși corespunde cu lungimea reală a legăturii între atomii de oxigen, nu poate explica paramagnetismul moleculei și invers, cel de-al doilea (O - O) deși explică paramagnetismul, legătura simplă nu corespunde cu lungimea reală a legăturii chimice formate. Pentru a indica existența celor doi electroni impari, Pauling admite că între atomii de oxigen ar exista o legătură specială, formată dintr-o legătură covalentă simplă și două legături formate din câte trei electroni ca :



Cea mai acceptabilă explicație o dă Teoria Orbitalilor Moleculari, conform căreia, din cei 12 electroni periferici, 2 electroni vor fi impari cu spinii paraleli, ocupând câte un orbital de antilegătură π^*. Acești electroni impari conferă paramagnetism moleculei de dioxigen.

Electronii împerecheați nu interacționează cu un câmp magnetic exterior deoarece câmpurile lor magnetice sunt orientate în sensuri opuse, anulându-se reciproc. Zece electroni sunt dispuși în perechi în cinci orbitali complet ocupați. Deci cei doi electroni de valență proveniți de pe nivelele L ale celor doi atomi de oxigen sunt așezați pe orbitalii moleculari obținuți din orbitalii atomici, rezultând o configurație electronică cu energie minimă.

Din diagrama orbitalilor moleculari ai dioxigenului se observă că cei doi orbitali atomici 2s interacționează și dau naștere la doi orbitali moleculari ce corespund la două nivele energetice, unul de legătură σ_{2s} și

altul de antilegătură σ^*_{2s}; aceeași situație se observă și pentru perechea de orbitali $2p_z$, respectiv σ_z și σ^*_z.

Orbitalii moleculari de legătură au energie mai mică decât orbitalii de antilegătură. Orbitalii atomici $2p_x$ și $2p_y$ de la cei doi atomi de oxigen se combină liniar și dau împreună orbitali moleculari π și π^*, care sunt dublu degenerați, având energii echivalente.

Pentru completarea tuturor orbitalilor moleculari, ar fi necesari 14 electroni. Cei doi electroni puși în comun, apar în orbitali lor de antilegătură π^* și au spinii paraleli, ceea ce conferă moleculei de dioxigen un caracter paramagnetic.

Schematic, dioxigenul are următoarea repartiție a electronilor: 8 electroni de legătură și 4 electroni de antilegătură:

$$(\sigma_s)^2(\sigma^*_s)^2(\sigma_z)^2(\pi_{xy})^4(\pi^*_{xy})^1(\pi^*_{yx})^1(\sigma^*_z)^0.$$

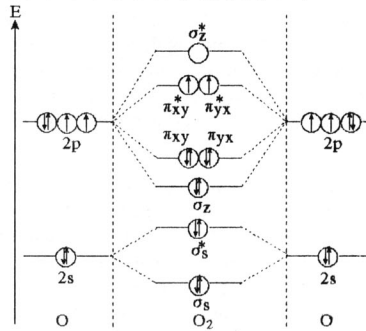


Figura VI.3. Diagrama combinării liniare a orbitalilor atomici la formarea moleculei de oxigen molecular.

Din figura VI.3, se observă că în molecula de O_2 sunt ocupați cu electroni patru orbitali moleculari de legătură și trei de antilegătură, doi dintre aceștia din urmă însă numai cu câte un electron.

Ordinul de legătură dintre cei doi atomi este egal cu jumătatea diferenței dintre numărul electronilor din orbitalii moleculari de legătură π și numărul electronilor din orbitalii moleculari de antilegătură π^*.

$$\text{Ordin de legătură} = \frac{n - n^*}{2} = \frac{8-4}{2} = 2$$

Deci între cei doi atomi există o legătură dublă. Existența legăturii duble explică energia de legătură mare și distanța interatomică mică în molecula dioxigenului:

$$\lambda_0 = 1{,}21 \text{ Å} \qquad ; \qquad E_l = -494{,}91 \text{ kJ/mol}$$

Caracterul diradicalic al moleculei de dioxigen rezultă din degenerarea orbitalilor π. În ionul O_2^{2-} în care toți orbitalii sunt ocupați cu electroni cu spin opus (cu excepția orbitalului de antilegătură σ_z^*) paramagnetismul dispare.

Datorită ocupării cu câte o pereche de electroni a orbitalilor de antilegătură π_{xy}^* și π_{yx}^*, ordinul de legătură în ionul O_2^{2-} devine egal cu 1, deci specia peroxid conține o legătură simplă.

Tendința oxigenului molecular de a câștiga electroni este foarte mare, după cum se vede din secvența redox și tabelul VI.1:

Tabelul VI.1. Configurația electronică a O_2, O_2^-, O_2^{2-}

$$O_2 \xrightarrow{+e^-} O_2^- \xrightarrow{+e^-} O_2^{2-} \xrightarrow{+2e^-} 2O^{2-}$$

σ_z^*	O_2	O_2^-	O_2^{2-}
	—	—	—
π_{xy}^* π_{yx}^*	↑ ↑	↑↓ ↑	↑↓ ↑↓
σ_z	↑↓	↑↓	↑↓
π_{xy} π_{yx}	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓	↑↓ ↑↓
ordinul de legătură	2	$1\frac{1}{2}$	1

Ce se întâmplă în cazul cedării unei perechi de electroni oxigenului molecular de către un reducător? Această pereche de electroni nu poate completa orbitalii liberi din interiorul moleculei de oxigen, din cauza perturbării momentelor magnetice.

Pentru a fi realizabilă adiția acestor electroni cu spini paraleli, va fi necesară o inversiune de spin a unui electron al oxigenului molecular, permițând astfel un transfer de electroni.

Dar inversia de spin este un proces lent și cu probabilitate mică, chiar dacă oxigenul și reducătorul respectiv sunt apropiați. Necesitatea unei inversii de spin, constituie o barieră pentru reactivitatea oxigenului molecular.

Așa se explică de ce dioxigenul, deși are un caracter de radical liber, având electroni impari, prezintă totuși o reactivitate limitată în condiții obișnuite.

VI.1.1. Activarea moleculei de dioxigen

Studii experimentale au stabilit că oxigenul poate exista în mai multe stări energetice. Oxigenul molecular în stare fundamentală se caracterizează prin doi electroni neparticipanți, cu moment unghiular de spin opus, situați pe doi orbitali diferiți și cu spinii paraleli.

Această stare a oxigenului molecular se numește *triplet* ; numărul cuantic $S = \frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$ iar multiplicitatea $J = 2S+1 = 3$.

Starea de triplet se notează $^3\Sigma_g^-$ sau $^3O_2$ și este considerată ca cea mai stabilă din punct de vedere energetic.

Reactivitatea redusă a $^3O_2$ este determinată de faptul că cei doi electroni din orbitalii moleculari de antilegătură π^* , având același spin, prin interacțiune chimică cu atomi sau molecule pot accepta, pentru a se cupla, electroni de spin contrar.

Aceasta ar însemna că atomii sau moleculele respective să aibă 2 electroni exteriori de același spin, însă de sens opus celor doi electroni exteriori ai moleculei de oxigen.

Din cauză că atomii sau moleculele au în marea lor majoritate numai perechi de electroni cuplați, rezultă că oxigenul triplet nu va putea accepta asemenea electroni, acceptare interzisă de regula spinului.

VI.1.1.1. Oxigenul singlet

Oxigenul triplet va deveni reactiv numai în cazul în care unul din cei doi electroni din orbitalii moleculari de antilegătură π^* își inversează spinul și prin aceasta să permită acceptarea electronilor cedați de la atomul cu care reacționează. Inversarea spinului unui singur electron din cei doi existenți în orbitalii moleculari de antilegătură π^* ai oxigenului triplet, se face numai prin absorbție de energie radiantă și trecerea dioxigenului într-o stare excitată *singlet* foarte reactivă.

Rezultă deci că molecula de dioxigen poate exista și în stări excitate *singlet*, bogate energetic și mult mai reactive decât în stare de triplet.

Numărul mare de reacții în care este implicat oxigenul se explică prin varietatea mare de specii reactive pe care le generează.

În prezent se cunosc două specii de singlet: prima stare notată cu $^1\Delta_g$ sau $^1O_2$ este cea mai importantă deoarece are o viață medie, teoretică, de 45 de minute, redusă însă practic la mult mai puțin din cauza marii reactivități. Această stare de singlet $^1O_2$ provine din $^3O_2$ prin inversarea spinului unui electron din cei doi impari și cuplarea lor în același orbital molecular de antilegătură π^*. În acest caz numărul cuantic devine : $S = \frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$ iar multiplicitatea $J = 2S + 1 = 1$. În această situație, oxigenul molecular devine foarte reactiv, în special față de substanțe având o densitate electronică mare (compuși aromatici), deoarece va tinde să-și completeze nivelul liber $2\pi^*$.

A doua stare excitată singlet, notată $^1\Sigma_g^+$ are o viață de 10^{-9} s, transformându-se în prima stare singlet înainte de a putea iniția reacții chimice. Din acest considerent major, prin denumirea de singlet se înțelege, în mod obișnuit, doar $^1O_2$.

Starea singlet a dioxigenului, a fost descoperită în cursul măsurătorilor de absorbție a luminii în atmosferă, încă din 1931 de către Childs și Mekle, dar abia în 1965 au fost reluate cercetările de către Badger și colaboratorii.

Structura electronică a dioxigenului indică imposibilitatea existenței unor tranziții electronice în vizibil sau ultraviolet, în schimb singletul a fost detectat în vizibil, cu benzi la 629, 577 și 477 nm.

Tabelul VI.2. Simbolurile stărilor spectrale şi proprietăţile lor.

Simbol de stare spectrală	Poziţia e⁻ în orbitalul π* de antilegătură	Nivelul energetic	Timp de existenţă
$^1\Sigma_g^+$		154,9 KJ/mol	10^{-9} sec
$^1\Delta_g$		92,1 KJ/mol	45 min
$^3\Sigma_g^-$		0	nelimitat

VI.1.1.2. Obţinerea oxigenului singlet

Se cunosc multe căi de producere a singletului şi în literatură apar mereu alte procese sau reacţii în care se dezvoltă $^1O_2$ (singlet). Reacţii în care se produce oxigenul singlet sunt:

— Reacţii de fotosensibilizare;

— Reacţia H_2O_2 cu o hipohalogenură de tipul OCl^-, este cea mai cunoscută şi mai utilizată;

— Reacţia H_2O_2cu un alt radical al oxigenului, superoxid $O_2^{\bullet-}$, este considerată ca o sursă potenţială de $^1O_2$ de interes biologic;

— Reacţia radicalului hidroxil $HO^{\bullet}$ cu $O_2^{\bullet-}$ produce $^1O_2$. Ca şi în cazul precedent (c) $HO^{\bullet}$ este un alt produs al reacţiei Haber-Weiss, descrisă în 1934 şi reactualizată ca având loc în procese biologice;

— Transferul unui electron de la $O_2^{\bullet-}$ la un acceptor adecvat, reacţie evidenţiată în cloroplastele iluminate;

— Transferul de electroni de la $O_2^{\bullet-}$ la radicali cationi, a fost explicat de Mayeda şi Bard;

— Dismutarea spontană a $2O_2^{\bullet-}$;

— Descompunerea spontană a ozonidelor;

— Descompunerea endoperoxizilor;

— Descompunerea hidroperoxizilor în microzomii hepatici;

— Diverse reacţii catalizate de enzime;

— Descarcări în atmosferă, acţiunea microundelor.

Cele mai folosite căi de generare a stării de singlet, sunt primele două, cu toate că nu s-a ajuns la o optimizare a metodelor. Prezentarea acestora nu va fi detaliată în această lucrare.

VI.1.1.3. Metode practice pentru obţinerea oxigenului singlet

VI.1.1.3.1. Metode fizice

Obţinerea oxigenului singlet se poate realiza prin:

— descarcări electrice de înaltă frecvenţă în atmosferă de oxigen;

— iradierea oxigenului lichefiat în freon 113, cu radiaţie laser.

Iradierea duce la obţinerea oxigenului singlet printr-un proces bimolecular interzis din considerente energetice:

$$O_2 + O_2 \xrightarrow{h\nu} {}^1O_2\,({}^1\Delta_g) + O_2$$

VI.1.1.3.2. Metode chimice

În laborator, oxigenul singlet se poate prepara prin reacţii chimice simple, cum ar fi:

— reacţia clorului molecular cu apa oxigenată:

$$Cl_2 + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2\uparrow + 2HCl$$

— reacţia bromului molecular cu apa oxigenată:

$$Br_2 + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2\uparrow + 2HBr$$

— descompunerea hipocloriţilor de sodiu sau potasiu cu apa oxigenată:

$$NaClO + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2\uparrow + H_2O + NaCl$$

$$KClO + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2\uparrow + H_2O + KCl$$

— descompunerea peracizilor în mediu alcalin:

$$2RCO\text{-}OOH \longrightarrow {}^1O_2\uparrow + 2RCOOH$$

$$RCO\text{-}OOH + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2\uparrow + RCOOH + H_2O$$

— reacţia nitrililor cu apa oxigenată, în mediu alcalin:

$$R\text{-}C \equiv N + H_2O_2 \longrightarrow R\text{-}\underset{\displaystyle OOH}{\overset{\displaystyle |}{C}}=NH$$

$$R\text{-}\underset{\underset{OOH}{|}}{C} = NH + H_2O_2 \longrightarrow {}^1O_2\uparrow + R - CO - NH_2 + H_2O$$

— descompunerea percromatului de potasiu :

$$4K_3CrO_8 + 2\,H_2O \longrightarrow 7\,{}^1O_2\uparrow + 4K_2CrO_4 + 4KOH$$

VI.1.1.3.3. Metoda fotosensibilizării

Această metodă este folosită cel mai frecvent pentru obținerea oxigenului singlet în laborator. Oxigenul singlet se formează din interacția oxigenului molecular triplet și molecula de sensibilizator S, excitată de către lumină sau radiație ultravioletă la starea singlet sau triplet.

Pentru stingerea stării excitate a sensibilizatorului de către moleculele de oxigen triplet, s-au stabilit următoarele mecanisme:

— pentru starea singlet a sensibilizatorului :

$${}^1S_1 + {}^3O_2 \longrightarrow {}^3S_3 + {}^1O_2\uparrow \qquad ({}^1\Delta_g,\ {}^1\Sigma_g^+)$$

$${}^1S_1 + {}^3O_2 \longrightarrow S_0 + {}^1O_2\uparrow$$

— pentru starea triplet a sensibilizatorului:

$${}^3S_1 + {}^3O_2 \longrightarrow S_0 + {}^1O_2\uparrow$$

Kearns și colaboratorii, precum și Tsubomura și colaboratorii, presupun formarea intermediară a unor " complecși de contact " sau a unor complecși de tipul celor cu transfer de sarcină între molecula în stare excitată a sensibilizatorului și oxigenul molecular. Acești complecși participă la mecanismul de transfer energetic dintre molecula fotosensibilizatorului și molecula de oxigen. Modul în care are loc această participare nu a putut fi complet elucidat.

Investigațiile teoretice se bazează pe calcule ale mecanicii cuantice și pe investigații experimentale. Astfel, s-a ajuns la concluzia că sensibilizatorii posedă o energie destul de mare în stare de triplet $E_T > 167{,}2$ kJ/mol și deci oxigenul singlet ${}^1O_2$ (${}^1\Sigma_g^+$) se obține prin reacția de transfer energetic.

În cazul sensibilizatorilor cu energie triplet E_T cuprinsă între 91,96 și 158,84 kJ/mol, se formează numai oxigen singlet ${}^1O_2$ (${}^1\Delta_g$). Ambele forme de oxigen singlet se formează când energia stării triplet E_T a sensibilizatorului este mai mare de 158,84 kJ/mol. Aceste rezultate ne pot indica faptul că formarea oxigenului singlet depinde în primul rând de

energia de excitare a sensibilizatorului. Oxigenul singlet obținut prin această metodă, se poate depozita foarte repede dacă nu este pus să reacționeze rapid cu un substrat. Ca sensibilizatori pot fi utilizați un număr deosebit de mare de coloranți organici: albastru de metilen, roșu de Bengal, eozina, eritrozina .

VI.1.1.3.4. Obținerea oxigenului singlet în organismele vii

Dioxigenul în prima stare excitată, singlet, poate să apară în foarte multe reacții, atât în domeniile chimiei anorganice și organice, cât și în natură sau în cursul reacțiilor metabolice din organismele vii. Din această multitudine de reacții, o parte se cunosc; în unele cazuri s-a putut măsura o chemiluminescență.

În ultimii ani s-au acumulat multe date privitor la producerea singletului $^1O_2$ și în organisme, ca urmare a activității metabolice.

Sursele principale de producere a $^1O_2$ în organismele vii pot fi grupate astfel:

— sisteme ce implică interacția radicalilor O_2 cu radicali organici, cum sunt cei implicați în formarea hidroperoxizilor, ROO• ;

— reacții ce implică intermediari ce aparțin speciilor activate ale oxigenului, cum sunt: $O_2^{\bullet}$; H_2O_2 ; HO• ;

— sisteme ce implică activarea enzimatică a dioxigenului, cum este activarea ciclo-oxigenazei din biosinteza prostaglandinelor;

— reacții de fotosensibilizare și efect fotochimic, cum sunt fotoalergiile ce apar în porfirii acute sau tratament îndelungat cu fenotiazine.

VI.1.1.3.5. Identificarea oxigenului singlet

Identificarea oxigenului singlet este o problemă destul de dificilă, deși se cunosc mai multe metode. Practic, oxigenul singlet are un timp de existență de la câteva microsecunde până la 45 de minute și o metodă directă ar fi măsurarea energiei eliberate prin descompunerea în $^3O_2$ (oxigen triplet).

Această energie este eliberată sub formă de foton, conform secvenței:

$$^1O_2 \rightarrow {}^3O_2 + h\nu$$

În această ecuație, cuanta emisă este plasată în domeniul infraroșu al spectrului, la 1269 nm și reprezintă diferența de energie între starea singlet și starea fundamentală a oxigenului triplet ($^3O_2$). Dar starea singlet poate trece în starea triplet și prin emisia unei cuante, ca urmare a unei ciocniri dimoleculare.

$$^1O_2 + {}^1O_2 \rightarrow {}^3O_2 + {}^3O_2 + h\nu$$

În acest caz, cuanta este emisă la 634 nm și poate fi detectată prin reacții chimice, cum ar fi reacția : $H_2O + OCl^-$.

Oxigenul singlet poate fi detectat prin folosirea unor inhibitori specifici, ce acționează asupra oxidărilor inițiate de singlet, reacționează chimic sau acționează fizic. Astfel de substanțe sunt carotenoizii, aminele terțiare, tocoferolii, azida de sodiu și histidina.

O altă metodă a fost sugerată de Merkel și colaboratorii, care au observat că timpul de existență al stării excitate singlet este prelungit semnificativ în apă deuterată, comparativ cu apa obișnuită. În fine, mai sunt unele reacții chimice, cum ar fi: transformarea difenilfuranului în dibenzoetilenă care, prin cuplare, pot servi la identificarea stării singlet printr-o serie de procese intermediare.

VI.1.2. Radicali liberi ai moleculei de dioxigen

Restricția de spin caracteristică oxigenului molecular se aplică și reducerii di-și univalente a acestuia la apă. Reducerea divalentă poate avea loc numai prin interacțiunea dioxigenului cu un ion metalic, care aparține elementelor de tranziție, paramagnetic și el (ca în cazul unor enzime ce conțin ioni de Cu^{2+} sau Fe^{2+}). Reducerea univalentă poate avea loc prin adiția la oxigen numai a unui electron pe etapă. Astfel, deși dioxigenul este un oxidant puternic având un potențial redox de +1,23 V, reacția

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O \qquad \text{(VI.1)}$$

decurge foarte încet la temperatură obișnuită, deoarece are loc treptat, implicând reacții intermediare, cu apariția unor specii mult mai reactive decât dioxigenul. Reducerea univalentă a oxigenului decurge prin următoarele secvențe:

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\bullet} \text{ sau } O_2 + H^+ + e^- \longrightarrow HO_2^{\bullet} \qquad \text{(VI.2)}$$

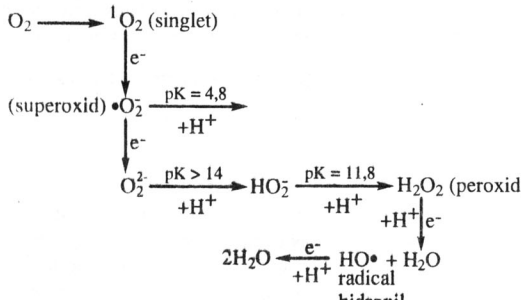
$$O_2^{\bullet} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 \qquad \text{(VI.3)}$$

$$H_2O_2 + H^+ + e^- \longrightarrow H_2O + HO^{\bullet} \qquad \text{(VI.4)}$$

$$HO\bullet + H^+ + e^- \longrightarrow H_2O \qquad (VI.5)$$

Din aceste secvențe de reacții se observă că reducerea univalentă a dioxigenului include formarea mai multor specii înalt reactive cum sunt superoxidul $O_2^{\bullet}$ din reacția (VI.2), peroxidul de hidogen, H_2O_2 din reacția (VI.3) și radicalul hidroxil $HO\bullet$ din reacția (VI.4). O viteză mai mare de reducere poate fi obținută numai când aceste procese au loc simultan, cuprinzând toate reacțiile parțiale și cu un schimb de mai mulți electroni. O astfel de reducere are loc pe cale enzimatică și necesită un substrat cu o poziție sterică fixă, așa cum este o macromoleculă tridimensională.

Reducerea O_2 la H_2O are loc în multe procese chimice și în mod obișnuit în procesele biochimice din organisme, la ele participând inclusiv formele active ale oxigenului: radicalul superoxid ($O_2^{\bullet}$), radicalul hidroxil ($HO\bullet$) și peroxidul de hidrogen (H_2O_2), denumiți și radicali liberi ai dioxigenului. Pe măsura creșterii reactivității oxigenului prin activare, acest element, prin radicalii liberi formați va reacționa cu apa extrăgând un proton și formând specii reactive : $HO_2^{\bullet}$; H_2O_2 și mai ales $HO\bullet$.



Reducerea O_2 la apă necesită 4 eletroni, iar reducerea echivalentă are loc în etape succesive de câte 1 electron, cu producere de specii reactive. Toxicitatea oxigenului se manifestă pe această cale.

În literatura medicală și chiar cea biochimică, se folosește termenul de radicali liberi ai dioxigenului, RLO_2 (RL = radical liber al dioxigenului), în care sunt incluse toate speciile reactive, indiferent de caracterul radicalului liber. În schema de mai sus, ce reprezintă reducerea univalentă a

oxigenului la apă, este prezentat modul în care se produc RLO_2 cu toxicitate înaltă, în special $HO\bullet$.

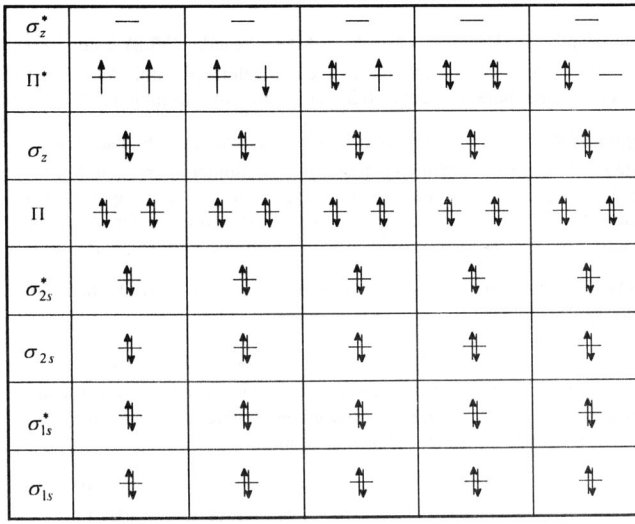
Pe cale evolutivă, organismele au favorizat totuşi o reducere tetravalentă a O_2 la apă, prin reacţia catalizată de citocromoxidază, care nu produce RL. Se apreciază că, reducerea univalentă a oxigenului reprezintă fiziologic aproximativ 5% din cantitatea totală de oxigen din organismul viu, cifră rezonabilă dacă ţinem seama de toxicitatea radicalilor liberi ai dioxigenului.

Structura electronică a dioxigenului explică de ce această moleculă diatomică, deşi poate fi socotită un diradical liber (datorită prezenţei a doi electroni necuplaţi) are o reactivitate mică. Pentru ca un donor de electroni să fie oxidat, trebuie să aibă loc o inversie de spin, fapt posibil ori prin reacţia O_2 cu metalele tranziţionale, paramagnetice (Cu, Fe, Mn) sau prin reducerea univalentă, în două etape a câte unui electron. Toate oxidările din natură se bazează pe aceste două căi, chiar dacă formele reactive care pot să apară sunt foarte variate. Metalele tranziţionale sunt implicate în formarea centrilor activi ale unor enzime, catalizatori ai proceselor redox, dintre care oxigenazele sunt capabile să catalizeze procese care implică reduceri cu câte un electron. Însă, întotdeauna, reducerea univalentă a dioxigenului produce radicali liberi reactivi. Creşterea reactivităţii oxigenului pe măsura activării sale, se datoreşte creşterii distanţei dintre atomii de oxigen, de la 1,12 Å la O_2 la 1,33 Å pentru $O_2^{\bullet}$ şi 1,49 Å în cazul O_2^{2-}.

VI.1.2.1. Ionul radical superoxid, $O_2^{\bullet}$

Acest radical liber, superoxidul, constituie prima etapă a activării dioxigenului pe calea reducerii univalente şi deci se formează prin captarea unui electron, care se plasează pe unul din orbitalii π^* (de antilegătură). Spre deosebire de $^1O_2$, care are un caracter diamagnetic, superoxidul este paramagnetic (figura VI.5.).

Din punct de vedere energetic, radicalul superoxid constituie o specie instabilă datorită potenţialului redox mic. Ionul superoxid are o viaţă foarte scurtă, trecând în H_2O_2 (reacţia VI.3). Această specie poate fi socotită ca un anion, o bază conjugată a unui acid slab $HO_2^{\bullet}$, ce are o valoare pK de 4,88 .



Stare fundamentală	Singlet	Superoxid	Peroxid	Singlet
O_2	$^1O_2$	$O_2^{\bullet-}$	O_2^{2-}	$(^1\Sigma_g^+)$
$(^3\Sigma_g O_2)$	$(^1\Delta_g O_2)$			

Figura VI.5. Structura electronică a moleculei de oxigen și a diferiților radicali liberi

Conversia spontană a $O_2^{\bullet}$ în H_2O_2 și O_2 are loc și prin reacții de dismutare :

$$HO_2^{\bullet} + HO_2^{\bullet} \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \text{(VI.6)}$$

$$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \text{(VI.7)}$$

$$O_2^{\bullet} + O_2^{\bullet} + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \text{(VI.8)}$$

Deoarece reacția (VI.7) are loc cu viteza cea mai mare, dismutarea spontană va fi mai rapidă la pH = 4,8 în prezența unor concentrații

echivalente de $HO_2^{\bullet}$ şi $O_2^{\bullet}$. În schimb, reacţia (VI.8) este lentă şi dismutarea decurge mai greu prin ridicarea valorii pH-ului. Aşa se explică de ce organismele vii au trebuit să-şi dezvolte o metodă de apărare reprezentată de acţiunea *superoxid dismutazei*. Procesul de dismutare a $O_2^{\bullet}$ este foarte complex, oferind cercetătorilor din domeniu un câmp foarte larg de investigaţii. Pentru găsirea unei explicaţii s-a făcut apel la reacţia Haber-Weiss de descompunere a H_2O_2 de către săruri de fer. Acest tip de reacţie este aplicat în procesele în care se produc radicali foarte activi ca $HO\bullet$, rezultaţi din procesul de dismutare a $O_2^{\bullet}$ şi a H_2O_2, mai ales în prezenţa unor catalizatori.

$$O_2^{\bullet} + H_2O_2 \longrightarrow HO^- + HO\bullet + O_2 \qquad \text{(VI.9)}$$

După toate probabilităţile, reacţia Haber-Weiss scrisă conform ecuaţiei (VI.9), constituie un mecanism generalizat. Din numeroasele aplicaţii practice ale acestei secvenţe, citâm :

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad \text{(VI.10)}$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO\bullet \qquad \text{(VI.11)}$$

reducerea complecşilor de Fe(III) de către $O_2^{\bullet}$ (reacţia VI.10) şi binecunoscuta reacţie Fenton (reacţia VI.11).

Ionul superoxid, $O_2^{\bullet}$, apare ca o specie reactivă intermediară în multe procese chimice şi se pare că proprietăţile sale distructive se datoresc trecerii în starea activată singlet.

Chimia radicalului superoxid a putut fi studiată adecvat abia după ce s-a găsit o sursă convenabilă de $O_2^{\bullet}$. Prepararea soluţiilor stabile de superoxid de potasiu KO_2, în solvenţi organici, a furnizat această sursă mai ales că această substanţă a început să fie utilizată şi pe scară industrială ca sursă de oxigen, la purificarea aerului în mine, submarine, spitale şi cabine spaţiale.

Superoxidul se poate prepara în soluţii relativ concentrate, stabile, de 0,2 M în medii aprotice, în solvenţi ca acetonitril sau dimetilsulfoxid. În

mediu organic, $O_2^{\bullet}$ are proprietăţi de agent reducător şi de nucleofil puternic.

Anionul superoxid poate fi obţinut în laborator, prin următoarele procese şi reacţii chimice :

1. Scindarea radiolitică în puls sau radioliză cu radiaţii gama.

$$2H_2O \longrightarrow e^-_{aq} + H^+ + H_2O_2 + H\bullet \qquad \text{(VI.12)}$$

$$e^-_{aq} + O_2 \longrightarrow O_2^{\bullet} \text{ şi } H\bullet + O_2 \longrightarrow HO_2^{\bullet} \qquad \text{(VI.13)}$$

2. Scindarea fotochimică a H_2O_2 prin iradiere cu radiaţii ultraviolete:

$$H_2O_2 \xrightarrow{h\nu} 2HO\bullet \; ; HO\bullet + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + HO_2^{\bullet} \qquad \text{(VI.14)}$$

$$HO_2^{\bullet} \longrightarrow O_2^{\bullet} + H^+ \qquad \text{(VI.15)}$$

3. Autooxidarea flavinelor, polifenolilor (pirogalol), chinone sau reacţia H_2O_2 cu ionul iodat sau ioni Ce^{4+}. În organismele vii, $O_2^{\bullet}$ poate fi produs prin numeroase procese şi reacţii încă insuficient cunoscute.

Tabel VI.3. Surse de ion radical superoxid în organismele vii

Surse endogene	Lanţuri de transport electronice din mitocondrii, cloroplaste şi reticul endoplasmatic; Enzime oxidante: galactoză, monoamin oxidaze, triptofan oxigenaze, lipoxidaza; Celule fagocitante: neutrofile, monocite, macrofage, enzimofile, endoteliale;
Surse exogene	Autooxidarea catecolaminelor, Fe^{2+}, thioli, hem etc.; Substanţe redox (antracicline, aloxan); Oxidări de compuşi ca paracetamol, CCl_4; Iradieri cu radiaţii ionizante, U.V., arsuri; Substanţe care oxidează glutationul (nitrili).

Reacţia Haber-Wiess, descoperită încă din 1934, este poate cea mai des menţionată reacţie din biochimia radicalului superoxid.

Indiferent de reactivitatea lui, formarea superoxidului constituie prima etapă a activării O_2 şi are loc în organism în condiţiile activităţii metabolice normale.

Oxigenul, deşi indispensabil vieţii, poate fi toxic, prin activare în formele active singlet ($^1O_2$) sau superoxid ($O_2^{\bullet}$). Aceste forme active pot acţiona ca atare sau prin producerea de peroxizi, fiind, în anumite limite, necesare desfăşurării proceselor metabolice.

VI.1.2.2. Radicalul hidroxil, HO•

Alături de $^1O_2$, radicalul HO• este cea mai puternică specie a oxigenului. Potenţialul redox al cuplului $OH\bullet/HO^-$ este de 1,4 V. Metoda cea mai simplă de formare a HO• este prin homoliza sau scindarea oxidativă a HO-OH sub influenţa căldurii sau a radiaţiilor U.V. şi ionizate.

În cursul reducerii O_2 la H_2O, conform reacţiei (VI.4) apare o formă activă a oxigenului, radicalul hidroxil, HO•.

O altă sursă de HO• este furnizată de reacţia Haber-Weiss aplicată în procesul de dismutare al $O_2^{\bullet}$ (reacţia VI.9) şi în reacţia Fenton (reacţia VI.11).

În organisme, căile cele mai probabile de obţinere a HO• provin din reacţiile de interconversie ale $O_2^{\bullet}$ şi H_2O_2, mai ales în prezenţa ionilor metalici (reacţiile VI.9, VI.11 şi VI.16).

$$Cu^+ + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{2+} + HO^- + HO\bullet \qquad \text{(VI.16)}$$

Radicalul hidroxil, HO•, se mai poate obţine prin radioliza apei, proces complex în cursul căruia se dezvoltă, o gamă largă de radicali liberi, specii active ale oxigenului şi e^-_{aq} : H• , HO•, H_2O_2, H_3O^+, HO_2^-.

Randamentul producţiei de HO• rezultat din radioliza apei depinde de prezenţa în anumite concentraţii a H_2O_2.

Radicalul hidroxil, HO• , reacţionează cu viteze mari cu absolut orice moleculă organică (RH) (glucide, aminoacizi, lipide, acizi nucleici, acizi organici).

$$HO\bullet + RH\bullet \longrightarrow HO^- + RH^+ \text{ sau } R\bullet + H_2O \qquad \text{(VI.17)}$$

Această reacție generală subliniază o proprietate esențială a HO• : producerea altor radicali liberi (R•) cu structuri variate. Astfel, citām extragerea unui H din metanol sau acizi organici.

$$CH_3OH + HO\bullet \longrightarrow CH_2OH + H_2O \qquad (VI.18)$$

sau transfer de electroni pentru compușii organoclolurați sau ioni de clor

$$Cl^- + HO\bullet \longrightarrow Cl\bullet + HO^- \qquad (VI.19)$$

Radicalul HO• poate reacționa instantaneu și cu carbonații (Na_2CO_3) formând radicalul carbonat cu capacitate reducătoare mare.

În acest sens, mulți cercetători cred că toxicitatea HO• ar fi datorată acestor radicali produși secundari (R•), derivați din aminoacizi, baze heterociclice cu azot, componente ale acizilor nucleici, glucide, ioni (Cl^-), care in vitro au inactivat bacterii, virusuri, ribozomi etc.

Reactivitatea foarte mare a HO• devine evidentă, comparată cu cea a superoxidului. Indiferent de acțiunea directă sau indirectă, formarea radicalului HO• foarte aproape de molecule critice ca ADN sau enzime de reglare, la distanțe adecvate (5 diametre moleculare sau 20 Å) poate avea efecte distructiv oxidative.

În condițiile reactivității foarte mari a radicalului hidroxil, se pune întrebarea care antioxidați naturali pot fi eficienți. Drept antidot natural, pe primul loc ar fi metalothioneinele, proteine care pot lega puternic o gamă largă de ioni metalici, printre care și ferul astfel că ar fi evitată o reacție Haber-Weiss.

După toate datele existente, radicalul HO• este înlăturat din organism în urma reacției cu albumina plasmatică, ce se găsește în concentrații suficient de mari (35-50 g/l) și cu glucoza din sânge.

VI.1.2.3. Peroxidul de hidrogen, H_2O_2

Adiția unui al doilea electron la $O_2^{\bullet}$ produce ionul peroxid, O_2^{2-}, care nu are electroni impari și nici caracter de radical liber. În organism, orice peroxid format va trece în forma cunoscută de H_2O_2 (peroxidul de hidrogen) datorită valorii foarte mari a pK. Peroxidul de hidrogen (apa oxigenată) se formează rapid prin reacțiile de dismutare ale $O_2^{\bullet}$ (reacțiile VI.6 - VI.8).

Ca și O_2, H_2O_2 este un agent oxidant slab, acționând mai ales asupra compușilor nesaturați (eteri) și triptofani.

Principalele reacţii chimice ale H_2O_2 au loc în prezenţa unor ioni metalici, conform secvenţelor anterioare VI.9, VI.11 VI.16 şi :

$$HO\bullet + H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2^{\bullet} + H^+ \qquad (VI.20)$$

$$Fe^{2+} + HO\bullet \longrightarrow Fe^{3+} + HO^- \qquad (VI.21)$$

Ţinând seama de activitatea unor oxidaze care produc H_2O_2 şi de transportul electronic mitocondrial, s-a apreciat o formare de 82 nmoli H_2O_2/g ţesut/minut. În ochiul uman (cristalin) se formează H_2O_2 în concentraţii micromoleculare, acelaşi nivel fiind observat şi în aerul expirat.

Dintre toate speciile reactive rezultate din activarea O_2, peroxizii au fost cel mai mult studiaţi şi aceasta din mai multe motive. În primul rând, peroxizii şi produşii lor de descompunere sunt cei mai stabili şi universal răspândiţi. În al doilea rând, peroxizii apar nu numai în organismele vii, ci şi în obiectele din jur cum sunt materialele plastice, cauciuc, vopsele, carburanţi etc.

În al treilea rând, din cauza implicaţiilor economice şi chiar militare, cercetările asupra cauzelor şi prevenirii peroxidării sub diferite forme (râncezire, îmbătrânirea materialelor plastice etc) au luat o amploare deosebită.

Peroxizii sunt veriga finală a activării O_2, incluzând şi produşii de degradare (aldehide, lipofuscina). Activarea oxigenului şi radicalii liberi formaţi reprezintă o amplificare a apariţiei altor tipuri de radicali. Această amplificare rezultă nu numai din reacţia radicalilor liberi produşi în diverse procese (exemplu: expunerea la radiaţii), dar şi activarea O_2 şi implicarea altor reacţii, cum sunt deteriorarea ADN-ului, lipidelor, perturbarea compartimentării unor ioni (Ca^{2+}) ori modificarea permeabilităţii membranelor celulare.

Peroxizii sunt produşi direct prin intermediul HO•, dar şi din starea singlet $^1O_2$, fapt confirmat experimental prin adiţie la dublele legături ale acizilor graşi, la acizii graşi polinesaturaţi, olefine, compuşi cu nuclee aromatice ca triptofanul.

Procesul de peroxidare mai are o caracteristică foarte importantă, implicând generarea unor *intermediari*, constând din radicali liberi sau produşi de degradare, care amplifică şi ramifică reacţiile oxidative astfel că pot cuprinde toate structurile favorabile. Aceste structuri cuprind acizi graşi polinesaturaţi, hemoproteine, acizi nucleici, glucide şi steroizi. Odată

formați, peroxizii (ROO•) vor reacționa cu o gamă mare de substanțe prin reacții de tipul :

— extragerea unui atom de H din poziții benzilice și alilice, aldehide, fenoli, compuși tiolici și aromatici, producând hidroperoxizi.

$$RO_2^{\bullet} + \dot{R}H \longrightarrow ROOH + R\bullet$$

$$RO_2^{\bullet} + \dot{R}SH \longrightarrow ROOH + \dot{R}S$$

— transfer de electroni, în special cu ioni metalici:

$$RO_2^{\bullet} + Fe^{2+} \longrightarrow RO_2^{-} + Fe^{3+}$$

— autooxidări ale peroxizilor, care constituie faza de propagare

$$RO_2^{\bullet} + RO_2^{\bullet} \longrightarrow 2RO\bullet + O_2$$

$$RO_2^{\bullet} + RO_2^{\bullet} \longrightarrow ROOR + O_2$$

$$RCH_2 - OO\bullet + RCH_2 - OO\bullet \longrightarrow RCH = O + RCH_2OH + O_2$$

— reacții cu diverse proteine, enzime, care au loc la nivelul grupărilor SH, hem, triptofanului sau a altor aminoacizi.

VI.1.3. Procesul de autooxidare și peroxidare

Reactivitatea moleculei de dioxigen stă la baza autooxidării, peroxidării înglobată în denumiri mai uzuale: îmbătrânire, deteriorare. Peroxidarea este un proces complex, cu multe variante, dependente de structura substraturilor și de condițiile de mediu.

După cum am mai arătat, datorită unei configurații electronice deosebite, oxigenul molecular posedă o inerție chimică relativă, care poate fi învinsă în urma activării în anumite condiții și producerii unor specii înalt reactive cum sunt starea singlet, de ion-radical superoxid, radical hidroxil, etc. Datorită acumulării de noi informații în domeniul activării dioxigenului, procesul de peroxidare, așa cum a fost studiat în anii 1950-1960 a fost reevaluat.

Autooxidarea, în concepția cea mai largă, de oxidare cu dioxigenul atmosferic, cuprinde un domeniu foarte vast, din care peroxidarea constituie doar o parte. Pentru a preveni autooxidarea numeroaselor substanțe organice este necesară cunoașterea mecanismului acestui proces. Peroxidarea constituie etapa inițială și principală a mecanismului autooxidării. Datorită structurii electronice particulare, dioxigenul are o

comportare aparte, deoarece acceptarea unui electron în moleculă va favoriza intrarea şi a celui de-al doilea electron.

Deci în peroxidare, oxigenul va fi un acceptor de electroni mai bun în stare activată decât în stare fundamentală şi autooxidările pot fi accelerate prin prezenţa unor donori de electroni, în cantităţi foarte mici, cum sunt o-difenolii.

Procesul de autooxidare decurge după tipul reacţiilor cu producere de radicali liberi: iniţierea unei reacţii în lanţ, propagarea de-a lungul lanţului şi întreruperea.

— *Iniţierea,* este prima etapă a peroxidării şi constă în producerea de radicali liberi derivaţi din substanţa R , ce suferă peroxidarea. Apariţia unor radicali liberi într-o substanţă organică se datoreşte unor factori externi (temperaturi ridicate, umezeală, presiune, oxigen) sau interni (impurităţi uşor oxidabile). Lumina, radiaţiile ionizante, ultravioletele mai ales, sunt de asemenea un factor extern favorizant. Aceşti factori externi, în anumite condiţii favorabile produc activarea O_2 şi dezvoltarea unor specii reactive (singlet, ion-radical superoxid, radical hidroxil) care, deşi au un timp de existenţă scurt, pot iniţia o reacţie chimică.

Deşi radicalii oxigenului pot apare ocazional, reacţiile pe care le declanşează sunt suficient de energice ca să iniţieze producerea unor radicali liberi ai substanţei organice studiate (RH).

$$RH \xrightarrow{\text{initiator}} R\bullet + H^+$$

$$2ROOH \xrightarrow{O_2} R\bullet + ROO\bullet + HO_2^{\bullet}$$

$$ROOH \xrightarrow{h\nu} R\bullet + HO_2^{\bullet}$$

— *Propagarea,* a doua etapă a peroxidării, caracterizată prin continuarea formării radicalilor liberi, în special a peroxizilor derivaţi din substanţa în curs de oxidare.

$$R\bullet + O_2 \longrightarrow ROO\bullet$$

$$ROO\bullet + RH \longrightarrow ROOH + R\bullet$$

$$ROOH \longrightarrow RO\bullet + HO\bullet$$

$$RO\bullet + RH \longrightarrow ROH + R\bullet$$

$$HO\bullet + RH \longrightarrow H_2O + R\bullet$$

— *Întreruperea* , se datoreşte unor reacţii între diferiţi radicali ce produc compuşi inactivi.

$$R\bullet + R\bullet \longrightarrow R - R$$

$$R\bullet + ROO\bullet \longrightarrow ROOR$$

$$R\bullet + HO\bullet \longrightarrow ROH$$

Este cunoscută autooxidarea acizilor graşi nesaturaţi cu catenă lungă, cu formarea peroxizilor lipidici, reacţie care depinde printre altele, de prezenţa dioxigenului şi a unor catalizatori sau inhibitori. Dioxigenul este cel care iniţiază reacţia, manifestând proprietăţi de diradical, prin interacţiunea cu speciile reactive, în urma căreia rezultă radicali peroxi liberi, declanşându-se o reacţie în lanţ. Viteza de oxidare creşte din cauza activării grupărilor - CH_2 - din vecinătatea sistemelor de legături duble conjugate sau a acţiunii catalitice a radicalilor liberi, proveniţi din descompunerea termică a diferitelor substanţe, care produc hidroperoxizii cu un randament mare. Radicalii liberi sunt foarte reactivi. Autooxidarea este inhibată de substanţe ca vitamina E, care se combină cu radicalii liberi formaţi.

Unele biometale tranziţionale (Fe, Cu, Co, Ni) sunt catalizatori energici ai peroxidării, datorită reacţiei:

$$M^{n+} + O_2 \rightarrow M^{(n+1)+} + O_2^-$$

la fel compuşii care conţin gruparea hem, prin acţiunea cărora se formează un complex cu hidroperoxidul lipidic, fără schimbarea stării de oxidare a ferului din gruparea hem, urmată de scindare şi producerea radicalilor liberi.

Dintre ionii metalici, Co^{2+} şi Mn^{2+} se numără printre cei mai activi în catalizarea peroxidării acizilor graşi nesaturaţi, dar cei care au în mod indiscutabil, rolul de catalizator principal, sunt ionii Fe^{3+} şi Fe^{2+}.

Se pare că mecanismul reacţiei de peroxidare catalizată de ionii metalici presupune formarea unor specii reactive, în faza iniţială a peroxidării :

$$Fe^{2+} + ROOH \longrightarrow Fe^{3+} + RO\bullet + HO^-$$

Peroxizii sunt oxidanţi puternici care pot modifica sau distruge compuşi biologic activi. Deşi producerea H_2O_2 este un proces normal în organismul viu (fiind într-un anumit context un produs necesar glandei tiroide), s-ar părea că are, pe baza observaţiilor in vitro şi in vivo pe animale, atât el cât şi peroxizii lipidici caracter de *agenţi mutageni*, conducând la modificări patologice.

VI.1.3.1. Acţiunea nocivă a radicalilor liberi ai oxigenului asupra materiei vii

Datorită reactivităţii sale lente, O_2 prezintă două aspecte: *de element indispensabil vieţii* şi *de toxic*, datorită formelor sale active şi a radicalilor liberi pe care îi formează şi care au un efect distructiv asupra organismelor vii. Această caracteristică a permis ca dioxigenul să constituie un factor deosebit de important în evoluţia vieţii pe pământ.

Deşi dioxigenul este indispensabil vieţii, el poate fi toxic prin activare, în formele active de singlet sau superoxid. Aceste forme active pot acţiona ca atare sau prin producere de peroxizi.

Spre deosebire de peroxidarea din medii nebiologice, unde odată apărută va evolua autooxidativ şi autocatalitic până la distrugere, în celulele vii există sisteme de protecţie foarte eficiente ce vor inhiba excesul de peroxizi la diferite nivele de formare.

Din cauza potenţialului redox ridicat şi a reactivităţii sale scăzute, dioxigenul ocupă o poziţie specială şi nu întâmplător a devenit un excelent combustibil pentru alimentarea proceselor metabolice aerobe.

Forma activă a dioxigenului adică oxigenul singlet reacţionează cu olefinele ducând la formarea hidroperoxizilor alilici. Aşa se explică formarea peroxizilor lipidici în urma reacţiei $^1O_2$ cu acizii graşi nesaturaţi sau oxidarea colesterolului. De altfel , oxigenul singlet reacţionează cu o gamă largă de substanţe organice, cum ar fi: heterocicli, hidrocarburi aromatice, hidrocarburi saturate, compuşi ce conţin heteroatomi (S, N), acizi graşi în special cei nesaturaţi, etc. Din aceste reacţii se formează endoperoxizi, dioxietani (produşi instabili ce se scindează spontan formând compuşi carbonilici, dintre care unii în stare excitată), oxizi. Aceşti produşi de reacţie vor genera în organismele vii apariţia unor noi radicali în materia organică, declanşând reacţii în lanţ. De aceea, Fridovich afirmă că „dacă oxigenul atmosferic ar fi compus numai din oxigen singlet, viaţa ar fi imposibilă, fiind atacată orice moleculă organică".

După cum s-a arătat deja, în timpul reducerii univalente a O_2 la apă apar unele specii înalt reactive cum ar fi :

— *ionul superoxid*, $O_2^{\cdot}$, care are o viaţă foarte scurtă, trecând în H_2O_2 prin reacţii de dismutare. În evoluţia lor organismele au găsit o armă de apărare faţă de excesul de superoxid, prin crearea superoxid dismutazei

(SOD), o enzimă ce stimulează conversia $O_2^{\bullet}$ în H_2O_2 şi O_2. Ionul superoxid apare ca o specie reactivă intermediară în multe reacţii şi se pare că proprietăţile sale distructive se datoresc trecerii în singlet.

— *radicalul hidroxil* , ce reacţionează cu viteze mari cu absolut orice moleculă organică (RH) cum ar fi: glucide, aminoacizi, lipide, acizi nucleici, acizi organici, etc, formând alţi radicali liberi (R•); toxicitatea HO• se datoreşte acestor radicali (R•) produşi secundari, derivaţi din aminoacizi, baze ale acizilor nucleici, glucide, ioni (Cl^-) care, in vitro au inactivat bacterii, virusuri, ribozomi, etc.

Radicalul HO• este înlăturat din organism în urma reacţiei cu albumina plasmatică şi cu glucoza din sânge. Pe măsura creşterii reactivităţii O_2 prin activare, acest element, prin radicalii liberi formaţi va reacţiona cu apa, extrăgând un proton şi formând alte specii reactive, cum sunt: $HO_2^{\bullet}$; H_2O_2 ;HO•.

Activarea oxigenului şi a radicalilor liberi formaţi duce la apariţia altor radicali ce pot determina deteriorarea ADN-ului, a lipidelor, perturbarea compartimentării unor ioni (Ca^{2+}) ori modificarea permeabilităţii membranelor celulare.

În concluzie, toxicitatea oxigenului începe din momentul activării, deoarece radicalii intermediari trec uşor unul în altul şi în cel de-al doilea rând, fiecare poate iniţia o reacţie în lanţ autooxidant. Aceasta (peroxidarea reacţiilor în lanţ) poate cauza în organismul uman : bătrâneţea, ciroza , anemii, ateroscleroză, diabet, inflamaţii etc.).

VI.2. Oxigenul molecular ca ligand în biocompuşii de coordinare

Proteinele principale cu funcţia de stocare şi transport de oxigen sunt cele care conţin fer (mioglobina, hemoglobina şi hemeritrina), cupru (hemocianina) şi vanadiu (hemovanadina).

Pentru stabilirea modului de interacţiune a oxigenului molecular cu aceşti compuşi de coordinaţie, este necesară cunoaşterea caracteristicilor principale ale grupării O_2^{z-} , care derivă din structura O_2 (tabelul VI.4).

Interacţiunea ireversibilă a ionilor metalici cu oxigenul molecular are loc în două moduri:

$$M^{n+} + O_2 \rightleftharpoons M^{n+}O_2$$
$$2M^{n+} + O_2 \rightleftharpoons M_2^{n+}O_2$$

Această reacție necesită menținerea condițiilor foarte riguroase privind la aspectele energetice și la simetria orbitalilor ionului metalic. Dioxigenul are o structură destul de complexă și se caracterizează prin prezența a trei orbitali de simetrie diferită care sunt capabili să formeze legături σ_g, π_u și π_g. Orbitalii σ_g și π_u pot acționa ca donori în timp ce orbitalul π_g poate fi acceptor datorită prezenței a două locuri vacante.

Tabelul VI.4. Caracteristicile ionului de tip O_2^{z-}.

Ionii	Plasarea electronilor în orbitali			Termenii și energia lor (eV)	Distanța O-O (Å)	Afinitatea față de proton (kJ/ mol)
	σ_g (p_z)	π_u (p_xp_y)	π_g^* (p_xp_y)			
Oxigen (O_2)	2	4	2	$^3\Sigma_g\ ^1A_g(23,4)\ ^3\Sigma_g(37,5)$	1,21	498,015
Superoxid (O_2^-)	2	4	3	$^2\pi_u$	1,28	1468,935
Peroxid (O_2^{2-})	2	4	4	$^3\Sigma_g$	1,49	2213,865

În timpul formării compusului coordinativ molecula dioxigenului poate avea atât proprietăți de donor cât și de acceptor de electroni. Variația energiei potențiale pentru starea fundamentală și stările excitate ale moleculei de dioxigen sunt indicate în figura VI.6.

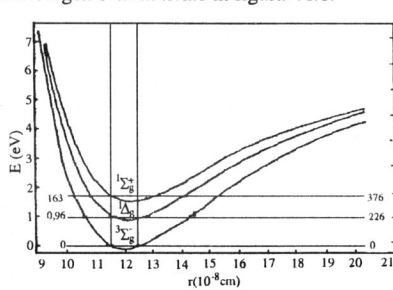


Figura VI.6. Variația energiei potențiale pentru starea fundamentală triplet $^3O_2$ și stările excitate singlet $^1O_2$ale moleculei de dioxigen.

Deci, se pot forma compuşi de coordinaţie destul de stabili ai dioxigenului cu biometalele numai dacă ionii metalici posedă un caracter dublu de acţiune a orbitalilor implicaţi (π-acceptor şi π-dativ).

În figurile VI.7 şi VI.8 se prezintă schematic interacţiunea orbitalilor ionului metalic cu cei ai dioxigenului în timpul formării complexului de tip "perpendicular".

Cum rezultă din figurile VI.7 şi VI.8 se observă că în aceşti compuşi de coordinaţie poate avea loc interacţiunea $d_{xz} \rightarrow \pi_g$; $\pi_u \rightarrow d_z^2$; $\sigma_g \rightarrow d_z^2$. Interacţiunea moleculei de oxigen cu orbitalii s şi p nu este indicată în schemă. Ea este de tip donor-acceptor : $\pi_u \rightarrow s$, p şi $\sigma_g \rightarrow s$, p. Din cauza diferenţei mari între energiile lor, aceste interacţiuni sunt foarte slabe.

Din figurile prezentate rezultă că "distanţele" între d_z^2 şi d_{xz} trebuie să fie minime; această condiţie se păstrează în compuşii de coordinaţie pătratici (capitolul 4) sau în compuşii de coordinaţie de tip bipiramidă tetragonală, în prezenţa ligandului corespunzător care se află pe axa z (vis-a-vis de molecula de oxigen).

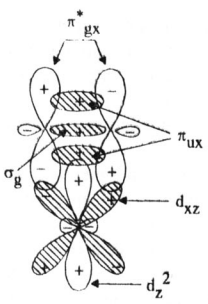


Figura VI.7. Schema structurii complexului cu oxigen "perpendicular": σ_g, π_{ux} şi π_{gx} sunt orbitalii O_2 ; d_{xz}, d_z^2 orbitalii metalului. Porţiunea haşurată reprezintă orbitalii ocupaţi, cea nehaşurată orbitalii liberi.

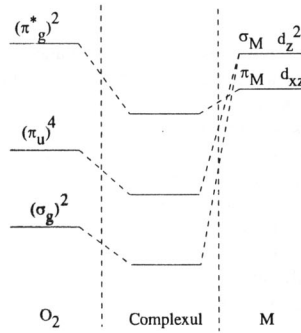


Figura VI.8. Schema OM în complexul MO_2.

Un astfel de ligand trebuie ca, într-un grad foarte redus, să cedeze electronii orbitalului d_z^2 şi, într-un grad mare să-i cedeze pe cei ai orbitalului d_{xz}.

Schema interacţiunii orbitalilor în compuşii de coordinaţie de tip M-O-O-M este prezentată în figura VI.9.

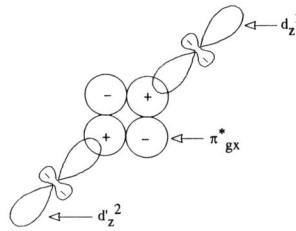


Figura VI.9. Interacţiunea orbitalilor în compuşii de coordinaţie ai dioxigenului de tipul M-O-O-M.

Într-o astfel de interacţiune, o parte din densitatea electronică se deplasează dinspre ionul metalic spre molecula oxigenului, sarcina pozitivă efectivă pe atomul metalic creşte, iar pe molecula oxigenului apare un exces de sarcină negativă, în acest caz legătura O-O se stabileşte.

Şi în compuşii de coordinaţie de tip 1:1 interacţiunea, care este analoagă cu cea descrisă aici poate avea loc.

Molecula dioxigenului are capacitatea de a accepta electroni şi din acest motiv este un foarte bun oxidant. Dacă ionii metalici au proprietăţi reducătoare, ei sunt oxidaţi uşor de către oxigenul molecular, cu transformarea celui din urmă în molecula de H_2O_2 sau chiar în H_2O.

Compuşii de coordinaţie cu O_2 se pot caracteriza încă printr-o proprietate foarte importantă şi anume prin dificultatea determinării gradului de oxidare al metalului în aceşti compuşi de coordinaţie.

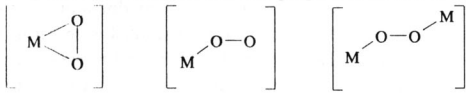
Prezentăm în tabelul VI.5 potenţialele de oxidare şi reducere a sistemelor cu participarea oxigenului molecular.

O parte din densitatea electronică se deplasează de la O_2 spre ionul metalic, în acest caz având loc un câştig de energie, datorită interacţiunii donor-acceptor şi formării orbitalilor moleculari care sunt localizaţi cu predilecţie pe molecula de dioxigen.

Tabelul VI.5. Potenţialele de oxidare-reducere care implică participarea O_2.

Sistemele	Potenţialele normale (V)
$O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$	-0,4
$O_2 + H^+ + e^- \rightarrow HO_2^-$	-0,1
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$	+0,68
$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$	+1,23

Cu toate acestea are loc şi un proces opus care decurge mai energic: deplasarea densităţii electronice de la metal pe orbitalii dioxigenului. Acest proces poate duce la deplasarea completă a electronilor către O_2 cu formarea ionilor O_2^- sau O_2^{2-} cu mărirea gradului de oxidare al metalului. Se poate presupune că se formează mereu grupări de atomi de tipurile:



în care determinarea gradului de oxidare al metalului este cel mai adesea imposibilă. Într-adevăr, ionul $[FeO_2Fe]^{+4}$ poate fi prezentat în trei moduri: $[Fe^{2+}O_2Fe^{2+}]^{+4}$, $[Fe^{3+}O_2^-Fe^{2+}]^{+4}$ şi $[Fe^{3+}O_2^{2-}Fe^{3+}]^{+4}$. Structuri asemănătoare se pot întâlni şi în compuşii de coordinaţie ai cobaltului cu punte de oxigen. Distanţa O-O în aceşti compuşi de coordinaţie este egală cu 1,31 Å, care este apropiată de distanţa din gruparea O_2^- şi deci structura acestui complex poate fi reprezentată schematic $[Co^{III}O_2^-Co^{III}]^{+5}$. O structură de acest tip se confirmă şi prin informaţiile obţinute din spectrele RPE; în acest complex avem numai un electron neîmperecheat. Molecula de dioxigen se prezintă ca un ligand neobişnuit iar compuşii de coordinaţie ai acestuia joacă un rol foarte mare în procesele vieţii. Specificul moleculei de oxigen în calitate de ligand este determinat de aceea că ea este simultan σ donoare (prin orbitalii π_u şi σ_g) şi π acceptoare (prin orbitalii π_g^*). În legătură cu aceasta este necesar să reamintim clasificarea biometalelor şi bioliganzilor propusă de Ţaţimirski (figura IV.6) bazată pe simetria legăturilor formate (σ sau π) şi pe capacităţile lor de donor-acceptor.

Divizarea cationilor şi metalelor în trei grupe (câte două subgrupe în fiecare) este destul de comodă. În adevăr toate particulele din grupa a treia (CO, NC^- şi posibil N_2) pot reacţiona cu acele centre ale metaloproteinei care reţin molecula de oxigen. Şi totuşi, această clasificare este destul de arbitrară.

Astfel, ionul NC^- care intră în gruparea IIIb a liganzilor (σ donori, π acceptori) este caracterizat de capacitățile de σ donor atât de puternice că poate forma legături stabile și fără interacțiunea de π acceptor (ionii H^+, Zn^{2+}, Cd^{2+}) adică cu cationii grupei IIa. Unii anioni din grupa IIb au capacități de π acceptori.

Studiul compușilor coordinativi cu oxigenul molecular în calitate de ligand continuă de mulți ani. Acești compuși prezintă un interes mare pentru chimia bioanorganică ca modele simple pentru sistemele biologice destul de complexe, care leagă reversibil oxigenul, îl stochează și îl transportă. Compușii cu oxigenul molecular, relativ stabili au un rol mare în calitate de „depozit" al oxigenului molecular.

Compușii de coordinație cu oxigen molecular formați de compuși ai Co(II) cu diferiți liganzi sunt mai bine studiați. Se cunoaște de mult timp că, compușii de coordinație binucleari ai Co cu doi atomi de oxigen în punte, se formează prin saturarea cu oxigen a soluțiilor de săruri de Co(II), în amoniac și în amine. Distanța O-O în unii din acești compuși de coordinație este de 1,1 Å și corespunde distanței caracteristice pentru ionul superoxid O_2^-.

Au fost studiați intensiv compușii de coordinație de Co(II) cu dioxigen, care conțin în calitate de liganzi bis-salicilaldehidetilendiamină, derivați ai ei, aminoacizi (histidină, lisină, arginină și serină) și peptide. Acești compuși de coordinație au o structură plană și formează o punte între doi atomi de Co.

Compuși de coordinație „reversibili" cu oxigenul molecular sunt formați și alte metale, dar structura lor nu prezintă interes pentru chimia bioanorganică și nu este este prezentată în această carte. În sfârșit, cea mai importantă funcție a biometalelor în organism, este participarea (în structura enzimelor) în procesele catalitice ale multor reacții implicate în procesele vieții. Vom prezenta în continuare unele metaloproteine pe care le întâlnim în natură, în lumea vie, capabile să fixeze și să transporte dioxigenul molecular.

VI.3. Proteine care fixează reversibil dioxigenul

VI.3.1. Mioglobina și hemoglobina

Mioglobina este o proteină în structura căreia intră 160 de aminoacizi (M=17800) și care conține o unitate hem.

Hemoglobina (M=64500) este o proteină tetrameră (două subunităţi) denumite α, conţin fiecare 141 de aminoacizi şi alte două subunităţi denumite β, care conţin fiecare 146 de aminoacizi) structura unei subunităţi de hemoglobină este reprezentată în figura II.3. În fiecare din aceste subunităţi este prezent un hem. Centrul activ de fixare a dioxigenului este ionul de fer din centrul hemului. Mioglobina este situată în muşchi. Ea preia oxigenul din hemoglobină, necesar în fosforilarea oxidativă a ADP-ului.

Curbele de saturare ale acestor două combinaţii coordinative în dioxigen, în funcţie de presiunnea dioxigenului sunt reprezentate în figura VI.10.

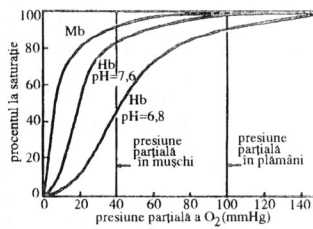


Figura VI.10. Curbele de saturaţie ale mioglobinei şi hemoglobinei, funcţie de presiunea dioxigenului.

Se observă că, în condiţiile de presiune ale dioxigenului, în muşchi, afinitatea mioglobinei pentru dioxigen este mult mai mare faţă de afinitatea hemoglobinei; în muşchi, hemoglobina cedează dioxigenul mioglobinei. Însă în plămâni, presiunea în dioxigen este suficient de ridicată pentru ca hemoglobina să se satureze în dioxigen.

Se observă de asemenea că afinitatea hemoglobinei pentru dioxigen este mai mică la un pH mai scăzut faţă de un pH mai ridicat. Într-un mediu bogat în CO_2 (deci la un pH mai scăzut), dioxigenul va fi mai uşor eliberat de către hemoglobină. Mai mult decât atât, când dioxigenul este eliberat de către hemoglobină, această moleculă captează protoni şi deci uşurează dizolvarea CO_2-ului în sânge sub formă de HCO_3^{2-}, ceea ce contribuie la eliminarea acestuia.

Aceste diferenţe de funcţionare între cele două proteine sunt esenţiale din punct de vedere biologic şi sunt legate de diferenţele care

există între structurile lor cuaternare. Structura tetrameră a hemoglobinei permite existența unui efect de cooperare pentru fixarea dioxigenului. Ideea fundamentală este că fixarea unei molecule de dioxigen pe unul din hemuri, favorizează fixarea următoarelor molecule pe alte hemuri.

Un astfel de comportament cooperativ poate fi modelat presupunând că hemoglobina există sub două forme R și T, forma T fiind mai stabilă (constanta de echilibru K). În forma R, cele patru subunități au o structură denumită R și în forma T, cele patru subunități au o structură denumită T. Particularitățile lor structurale sunt astăzi cunoscute bine.

Constanta de afinitate pentru dioxigen a formei R (K_R) va fi mai mare decât constanta de afinitate pentru dioxigen a formei T (K_T). Se poate atunci demonstra că aceste ipoteze vor conduce la un comportament cooperativ. În acest caz, fixarea primei molecule de dioxigen deplasează echilibrul R $\rightleftharpoons$ T spre stânga, ceea ce ușurează fixarea următoarelor molecule de dioxigen.

Vom prezenta verificarea acestor afirmații, în cazul unui dimer pentru care forma T nu va avea nici o afinitate pentru O_2. Se stabilesc următoarele echilibre:

$$R_2 \rightleftharpoons T_2 \qquad K$$
$$R_2 + O_2 \rightleftharpoons R(RO_2) \qquad K_R$$
$$R(RO_2) + O_2 \rightleftharpoons (RO_2) \qquad K_R$$

Proporția în dimer oxigenat este atunci:

$$\alpha = \frac{K_R P_{O_2} + K_R^2 P_{O_2}^2}{1 + K + K_R P_{O_2} + K_R^2 P_{O_2}^2}$$

Panta la origine este:

$$\frac{d\alpha}{dP_{O_2}} = \frac{K_R}{1+K}$$

care, pentru un K suficient de mare, este mult mai mică decât K_R, ceea ce dă reprezentării grafice $\alpha = f(P_{O_2})$ o alură "sigmoidă" caracteristică efectului cooperativ. Se observă clar că, apariția formei dimere este absolut necesară pentru apariția efectului cooperativ.

Explicația moleculară a comportării formelor R și T este astăzi cunoscută. Înainte de toate trebuie notate transformările fundamentale care

se produc în jurul hemului, când se fixează o moleculă de dioxigen (figura VI.11).

În forma dezoxi, ionul Fe(II) se găseşte în afara planului porfirinei fiind legat de gruparea imidazol a unei histidine. După fixarea dioxigenului atomul de fer revine în planul porfirinei.

În forma R, histidina se deplasează uşor pentru a acompania această fixare a O_2 - ului. În forma T, această mobilitate este împiedicată şi afinitatea pentru O_2 este mult redusă.

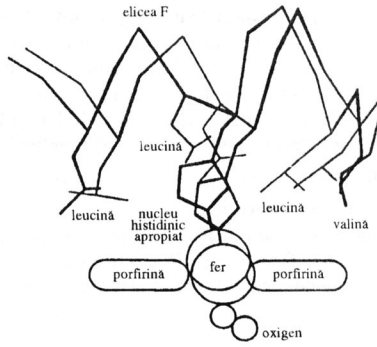
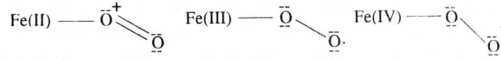


Figura VI.11. Modificările structurale ale hemului după fixarea moleculei de dioxigen.

VI.3.1.1. Proprietăţi spectrale

După cum s-a arătat în capitolul 2, forma dezoxi conţine ionul de Fe(II) de spin înalt. În forma oxi sistemul are spinul electronic egal cu zero.

În teoria formală a lui Lewis, se pot scrie mai multe repartizări ale electronilor între atomul de fer şi molecula de dioxigen:



Prima sugerează că nu are loc un transfer de electron spre molecula de dioxigen; gradul de oxidare al ferului va rămâne (II); Fe(II) va trece în

starea de spin scăzut sub influenţa O_2 şi se va deplasa deasemena spre centrul porfirinei. Se poate considera că are loc un transfer de unul sau doi electroni spre molecula de dioxigen. În cazul transferului unui electron, vom avea Fe(III) şi ionul superoxid; diamagnetismul apare datorită unui cuplaj antiferomagnetic puternic între un ion Fe(III) de spin scăzut şi un radical superoxid. În cazul transferului a doi electroni, se va forma un ion Fe(IV) şi un ion peroxo; Fe(IV) va avea electronii proprii grupaţi în perechi, ceea ce explică perfect proprietăţile diamagnetice observate experimental. Prima şi a doua structură electronică sunt cele mai frecvent recunoscute în literatura de specialitate care se referă la acest subiect. Aceste formule descriu într-o manieră foarte simplă interacţiunea dintre Fe(II) şi O_2. Unul din merite ar fi că, forma unică a fragmentului $[FeO_2]$ (determinată experimental) poate fi prevăzută şi înţeleasă prin acelaşi formalism ca şi în cazul moleculei de H_2O sau O_3. Referitor la interacţiunea cu CO, se pot scrie următoarele repartizări ale electronilor:

$$\mathrm{Fe(II)} - \mathrm{O} \equiv \mathrm{O}^{+} \qquad \mathrm{Fe(IV)} = \mathrm{O} = \underset{\cdot\cdot}{\overset{\cdot\cdot}{\underline{\mathrm{O}}}}$$

care explică forma liniară observată.

Pentru dioxigen, se poate descrie asemănător repartizarea electronilor care implică formarea Fe(IV), într-o manieră care transformă efectul donor în retrodonor de electroni, de la metal spre dioxigen:

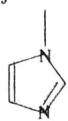
$$\mathrm{Fe(IV)} = \overset{\cdot\cdot}{\underset{(+)}{\mathrm{O}}} \diagdown \underset{(-)}{\underset{\cdot\cdot}{\overset{\cdot\cdot}{\underline{\mathrm{O}}}}}^{-}$$

Mai exact sunt luaţi în considerare orbitalii de frontieră, cum ar fi orbitalii 3d ai ionului de fer şi orbitalii moleculari care corespund configuraţiilor $\sigma\ \pi\ \pi$ ai dioxigenului sau $\pi\ \sigma\ \pi$ ai CO. În cazul CO, orbitalul σ este puternic donor vis a vis de Fe(II) ce atrage realizarea unei stari de spin scăzut pentru acest ion iar orbitalii fără electroni π^* acceptă prin retrodonare electroni de la Fe(II). Această donare şi retrodonare este foarte eficace din cauză că orbitalii π^* sunt vacanţi şi apropiaţi energetic de orbitalii ferului. Mai mult, ei sunt mai importanţi pe atomul de carbon din CO faţă de atomul de oxigen. Cu participarea a doi orbitali π^*, sistemul Fe-CO devine liniar. În cazul O_2, orbitalul σ participă la formarea legăturii cu ionul metalic, fiind mai coborât energetic faţă de orbitalul σ din CO, perturbând mai puţin ionul de Fe(II). Donarea şi retrodonarea este puţin eficace pentru CO în realizarea legăturilor şi fără îndoială orbitalii π^* sunt parţial ocupaţi. Aceste diferenţe au consecinţe importante în ceea ce

privește proprietățile electronice. Rolul relativ scăzut al orbitalilor π^* în donare și retrodonare suprimă argumentul în favoarea liniarității. Au fost aduse și alte argumente în favoarea neliniarității, dar ele depășesc cadrul acestei discuții. În realitate legătura Fe-O_2 pare interermediară între Fe(II) (spin scăzut) O_2 (S = 0) și Fe(II) (S = 1, spin intermediar) O_2 (S = 1) cuplați antiferomagnetic pentru a da o stare S = 0. Se vede că interacțiunea Fe-O_2 este mult mai complexă față de interacțiunea Fe-CO; este foarte posibil ca aceste moduri de interacțiune să fie mai bine elucidate prin studii detaliate în anii următori. Complexitatea interacțiunilor Fe-O_2 justifică interesul actual al specialiștilor pentru acest domeniu.

VI.3.1.2. Modele chimice

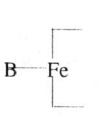
Imitarea fixării reversibile a dioxigenului de către compușii de coordinație porfirinici ai ferului, a fost obiectul a numeroase lucrări științifice actuale. Dificultățile experimentale majore, se referă la stabilitatea redusă a derivaților pentacoordinați ai Fe(II) și la oxidarea ireversibilă de către dioxigen a compușilor de coordinație porfirinici ai Fe(II), în complecșii dinucleari PFe(II)-O-Fe(III)P, unde P desemnează anionul porfirinic. În ceea ce privește stabilitatea redusă a compușilor coordinativi pentacoordinați, în raport cu compușii hexacoordinați, această dificultate a fost depășită utilizând liganzi axiali împiedicați steric ca 1,2 dimetil imidazolul, care se apropie suficient de ciclul porfirinic pentru ca Fe(II) să iasă din planul porfirinic în direcția nucleului imidazolic, ceea ce jenează coordinarea în trans a celui de-al doilea nucleu de imidazol.



O altă posibilitate, constă în formarea legăturii covalente între o grupare imidazolică și un ciclu porfirinic. Formarea secvenței PFe-O-FeP prin acțiunea O_2 asupra PFe(II) este un obstacol important în modelarea cercetării. Bineînțeles că această problemă nu se referă la proteinele naturale. Mecanismul formării acestei specii foarte stabile s-a elucidat recent :

$$2PFe(II) + O_2 \rightarrow PFe(III)\text{-}O\text{-}OFe(III)P$$
$$PFe(III)\text{-}O\text{-}O\text{-}Fe(III)P \rightarrow 2PFe(IV)O$$
$$2PFe(IV)O + PFe(II) \rightarrow PFe(III)\text{-}O\text{-}Fe(III)P$$

Pentru a se putea evita această reacție este necesară sintetizarea unei porfirine „pichetate" care împiedică apropierea celor două porfirine,



apropiere necesară pentru formarea derivatului peroxo. Această strategie a permis lui Collman şi colaboratorilor săi, obţinerea moleculelor PFe-O_2 şi PFe-CO (figura VI.12).

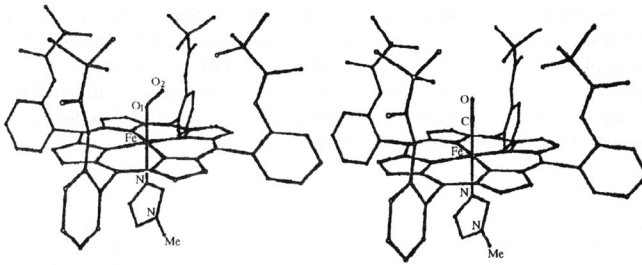


Figura VI.12. Porfirinele pe bază de fer "pichetate"; forma cu O_2 (stânga) şi CO (dreapta).

Se observă forma pliată pentru Fe-O_2 şi forma liniară pentru PFe-CO. În figura VI.12, ligandul axial utilizat este 1-metil-imidazolul, în acest caz neexistând împiedicare sterică (se apropie fără a fi jenat de porfirină). Acest sistem este un foarte bun model al hemului unei hemoglobine R. Aceeaşi autori au preparat cu 2-metil-imidazolul un compus de coordinaţie 2-metil-imidazol/fer-porfirină"pichetată"/O_2 în care prin împiedicare sterică, ferul nu se poate deplasa în planul porfirinei. Acest sistem este un model pentru forma T a hemoglobinei.

VI.3.2. Hemeritrina

Această proteină este utilizată de către vieţuitoarele marine pentru fixarea dioxigenului. Forma ei cea mai cunoscută este un octamer cu M = 108.000, care conţine doi atomi de fer pe subunitate. Contrar proteinelor precedente, ea nu conţine un macrociclu porfirinic. Structura ei este cunoscută atât în forma oxi cât şi dezoxi. Structura centrului activ este prezentată în figura VI.13.

În forma dezoxi, cei doi ioni de fer au gradul de oxidare II şi sunt uniţi printr-o punte hidroxo. Un ion de fer este hexacoordinat, Fe_1 şi altul pentacoordinat Fe_2. Distanţele sunt, Fe_1- O = 2,15 Å şi Fe_2 - O = 1,88 Å. În forma oxi, cei doi ioni de fer se găsesc la starea de oxidare III şi sunt "puntaţi" printr-o grupare oxo.

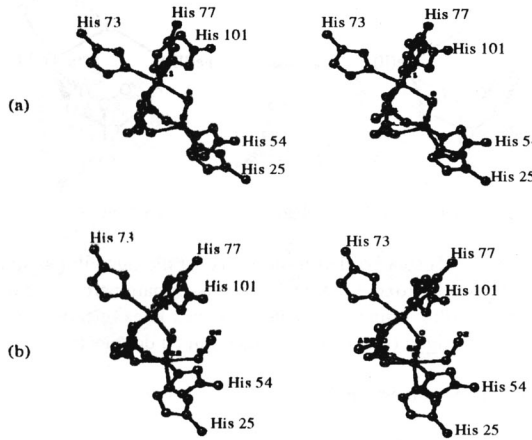


Figura VI.13. Vedere stereoscopică a dezoxi (a) şi oxi (b) hemeritrinei.

Ionul Fe_2 este menţinut legat de ionul peroxid. Distanţele sunt Fe_1 - O = 1,88 Å şi Fe_2 - O = 1,79 Å. Această scurtare a legăturii se traduce prin oxidarea ferului şi deprotonarea punţii. Distanţa Fe_2 - O (peroxi) va deveni 2,15 Å.

Centrii activi ai formelor met şi oxi, conţin doi ioni de Fe(III). Cu toate acestea, practic nu poate fi detectat nici un semnal RPE care ar putea fi atribuit Fe(III). Această "tăcere" în RPE este datorată unei interacţiuni foarte puternice între spinii celor doi ioni de Fe(III) conform teoriei discutate la capitolul 5. Starea fundamentală a centrului activ are un spin electronic S egal cu zero. Constanta interacţiunii de spin a fost măsurată prin diferite metode, fiind egală cu J = -200 cm^{-1}. Unul din factorii care explică această interacţiune puternică, este scurtarea distanţei Fe - O (din punte).

Pentru forma dezoxi, măsurătorile magnetice au demonstrat că cei doi ioni de Fe(III) sunt de spin înalt, iar spinii electronici corespunzători sunt slab cuplaţi (J = -30 cm^{-1}).

Datele cristalografice obţinute sunt în acord cu mecanismul de fixare al dioxigenului dedus din studii spectrale.

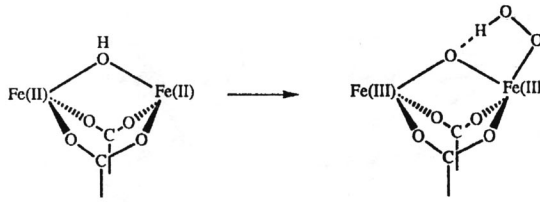
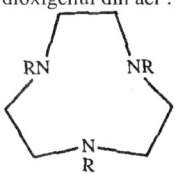


Figura VI.14 Transferul protonului grupei puntante.

Cei doi ioni de Fe(II) sunt oxidaţi în urma fixării dioxigenului şi simultan, protonul din puntea hidroxo este transferat pe o grupare peroxo. Se observă importanţa protonului grupei puntante şi conexiunea electronică a doi electroni de către oxigen (reducerea dioxigenului cu doi electroni).

VI.3.2.1. Modelarea hemeritrinei

Foarte recent, chimiştii bioanorganicieni au sintetizat molecule cu doi atomi de fer, care reproduc diferite stări ale centrului activ din hemeritrină. Aceste studii au contribuit la înţelegerea mecanismului molecular al hemeritrinei şi al altor enzime de acelaşi tip. Dintre aceste enzime, cea mai interesantă este fără îndoială Metan-Mono-Oxigenaza (MMO), care este capabilă să hidrolizeze metanul în metanol utilizând dioxigenul din aer .



Utilizând ligandul tri pirazol borură $HB(pz)_3^-$, grupul de cercetare al lui Stephen J. Lippard a putut prepara în laborator un sistem dinuclear de tipul $HB(pz)_3Fe(III)O(CH_3CO_2)_2Fe(III)(pz)_3BH$ (figura VI.13), care este un model foarte bun al formelor oxidate ale hemeritrinei. Grupul lui G. Wieghart a utilizat liganzi în formă de coroană $(CH_2NR)_3$, notat cu L pentru obţinerea unei molecule asemănătoare cu cea precedentă $[LFe(III)O(CH_3CO_2)_2Fe(III)L]^{2+}$.

Aceste molecule au proprietăţile electronice foarte apropiate de ale centrului activ natural.

$[LFe(II)OH(CH_3CO_2)_2Fe(II)L]^+$ a putut fi şi el preparat în laborator, furnizând un model foarte bun pentru forma dezoxi a hemeritrinei. Totuşi

modelarea fixării dioxigenului pe molecule de acest tip nu a fost încă realizată.

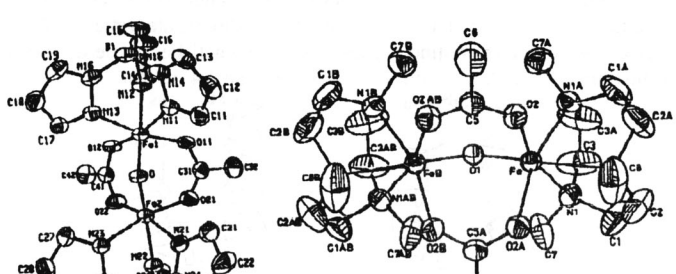


Figura VI.15. Structura modelelor centrului activ pentru hemeritrină.

Un inconvenient al modelelor moleculare discutate este, fără îndoială, faptul că nici una nu reproduce centrul coordinativ unde se poate fixa suficient de labil dioxigenul. În prezent cercetările continuă cu perseverenţa în acest domeniu.

VI.3.3. Hemocianina

Hemocianina este o proteină care fixează reversibil dioxigenul, fiind utilizată de către moluşte. Ca şi hemeritrina, ea nu conţine unităţi hem, în contradicţie cu denumirea pe care o are. Hemocianina artropodelor este formată din hexameri sau din multixehameri; fiecare subunitate are o masă moleculară în jur de 75000, şi conţine de la 400 la 650 de aminoacizi şi doi ioni de cupru. Hemocianina cu masa moleculară cea mai mare este hemocianina de crab, formată din 8 unităţi hexamere de masă 3.10^6.

Hemocianina din moluşte, conţine şi ea unităţi dinucleare de cupru, dar structura lor cuaternară este total diferită. Acestea sunt molecule cilindrice de 10 sau 20 de subunităţi. Masa lor moleculară poate atinge 9.10^6. Centrele care conţin cupru sunt situate pe unităţile denumite funcţionale, de masă M = 50000 care se repetă de 7 sau 8 ori pe fiecare subunitate. Se poate remarca că faţă de hemoglobină şi hemeritrină, o

subunitate de hemocianină, care conţine o entitate dinucleară de cupru, este formată din mai mulţi aminoacizi.

Practic, a putut fi determinată structura unei "mici" hemocianine hexamere, a unei varietăţi de homar, prin radiocristalografie, în forma dezoxi. Centrul activ conţine doi ioni de Cu(I) legaţi fiecare de trei resturi de histidină (figura VI.16). distanţa C - Cu este de 3,4-3,7 Å.

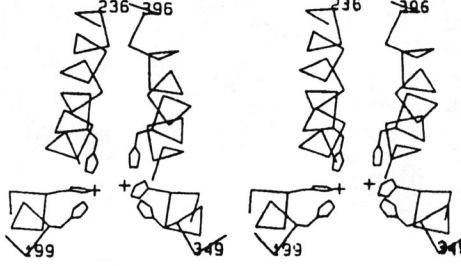


Figura VI.16. Structura centrului activ al dezoxihemocianinei.

Oxihemocianina nu dă semnal în RPE, dar prezintă o bandă de absorbţie foarte puternică la 345 nm. Distanţa dintre cei doi ioni de cupru a fost determinată prin EXAFS.

N.Kitajima a propus un model pentru reacţia de fixare a dioxigenului (figura VI.17):

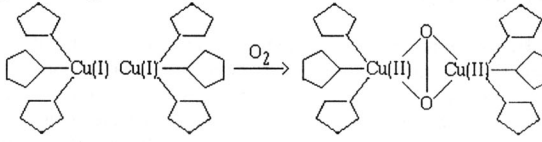


Figura VI.17. Modelul lui Kitajima pentru reacţia de fixare a dioxigenului.

Dioxigenul este redus la gruparea peroxo şi va forma o punte între doi atomi de cupru care sunt menţinuţi la starea de oxidare II. În ciuda prezenţei ionilor de Cu(II), sistemul nu dă semnal în RPE, datorită unui cuplaj antiferomagnetic analog celui întâlnit la oxihemeritrină. Banda intensă din spectrul electronic de absorbţie este datorată transferului de sarcină de la ionul peroxo spre ionul Cu(II).

VI.3.3.1. Modelarea hemocianinei

Aceste descoperiri în chimia bioanorganică, au dat un impuls suplimentar studiului moleculelor care conţin ioni de cupru. K.Karlin şi colaboratorii săi au studiat reactivitatea compuşilor de coordinaţie dinucleari ai Cu(I) cu dioxigenul (figura VI.18).

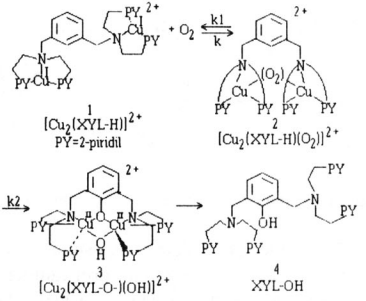


Figura VI.18. Reactivitatea unui complex dinuclear al Cu(I) cu O_2.

Ligandul XYL-H (reprezentat în figura VI.14) formează un **complex dinuclear** al Cu(I) (specia 1 $[Cu_2(XYL\text{-}H)]^{2+}$, care reacţionează cu dioxigenul pentru a se obţine compusul peroxo (specia 2) $[Cu_2(XYL\text{-}H)O_2]^{2+}$. Acest compus nu este stabil şi se transformă prin hidroxilare la poziţia 2 a ciclului benzenic, în specia 3. Reacţia arată fixarea ireversibilă a dioxigenului în acest sistem şi este interesantă în perspectiva modelării monoxigenazei pe bază de cupru.

Recent s-au făcut progrese referitoare la modelarea fixării dioxigenului pur, utilizând ligandul $N(CH_2Py)_3$ (figura VI.19).

Cu acest ligand se poate obţine o specie $LCu(I)(RCN)^+$ (specia 14 din figura VI.19). R-CN este un nitril utilizat ca solvent. Dacă în soluţia portocalie a acestui compus, la -80°C se barbotează dioxigen, se obţine un compus de coordinaţie de culoare violet intensă. Complexul sintetizat nu dă semnal în RPE. Reacţia poate fi deplasată în sens invers, degazând soluţia şi lăsând sistemul să se încălzească. Soluţia se va decolora prin reformarea $LCu(I)(RCN)^+$. Reacţia de oxigenare poate fi introdusă în ciclu

şi acest ciclu se poate efectua de mai multe ori, fără degradarea compusului de coordinaţie.

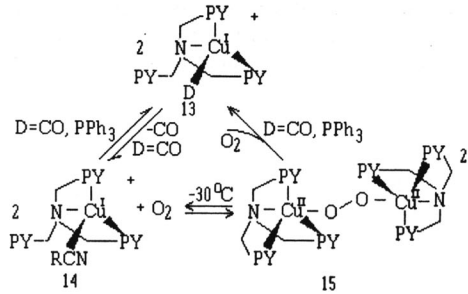


Figura VI.19. Fixarea reversibilă a dioxigenului de către complexul mononuclear al Cu(I).

Au putut fi obţinute şi cristalele compusului de coordinaţie în forma oxigenată. Structura lor a fost determinată prin radiocristalografie (figura VI.20). Se obţine un compus de coordinaţie Cu(II)-O-O-Cu(II), distanţa Cu-Cu = 4,359 Å. Comparând datele structurale şi cele spectroscopice cu cele ale oxihemocianinei, s-a observat că acest compus de coordinaţie nu este un model structural perfect.

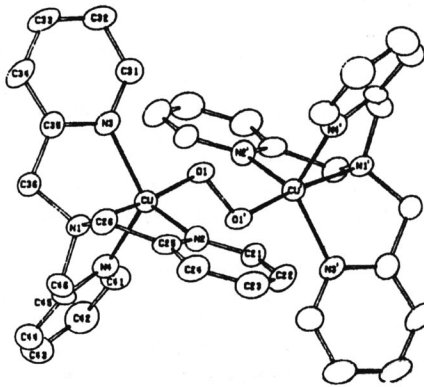


Figura VI.20. Structura compusului coordinativ artificial Cu(II)-O-O-Cu(II).

Recent, grupul de cercetare condus de către Kitajima, a contribuit într-o manieră spectaculoasă la elucidarea funcționării hemocianinei, sintetizând un model chimic care prezintă toate caracteristicile oxihemocianinei. Ei au utilizat în sinteză un ligand din familia tri pirazol boratului, împiedicat steric cu radicali izopropil (figura VI.21).

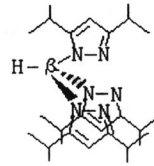


Figura VI.21. Tri pirazol boratul împiedicat steric.

Acest ligand L⁻ formează cu Cu(I) un sistem izolabil LCu. Moleculele de acest tip sunt foarte sensibile la acțiunea dioxigenului.

$$LCu(I) \xrightarrow[-78^0C]{O_2} LCu(II) - O - O - Cu(II)L$$

Produsul care a reținut oxigen (oxidat) a putut fi cristalizat și structura sa a fost determinată prin radiocristalografie (figura VI.22).

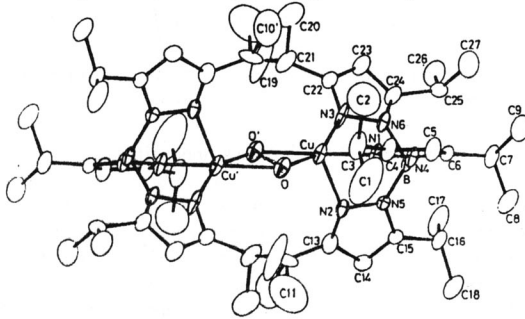


Figura VI.22. Structura radiocristalografică a complexului $LCuO_2CuL$.

Se remarcă modul de coordinare foarte diferit al dioxigenului față de compusul coordinativ peroxidic izolat de către Karlin. Distanța Cu-Cu determinată este de 3,560 Å. Aceasta este mult mai apropiată de distanța Cu-Cu determinată în oxihemocianină prin EXAFS, față de cea

determinată din modelul lui Karlin. Distanța O-O determinată este de 1,412 Å, intermediară între cea din O_2 de 1,21 Å și din H_2O_2 de 1,49 Å.

Spectrele de absorbție în domeniul ultraviolet-vizibil ale oxihemocianinei și ale modelului lui Kitajima sunt prezentate în figura VI.23.

Acestea sunt dominate de benzile cu transfer de sarcină peroxo-Cu(II). Asemănarea lor este frapantă. Studiile prin sinteze chimice, respectiv prin modelare, au condus la interpretarea datelor referitoare la fixarea dioxigenului de către hemocianină. Foarte recent a fost stabilită structura oxihemocianinei prin difracție cu raze X. În acest mod ipoteza lui Kitajima a fost complet verificată.

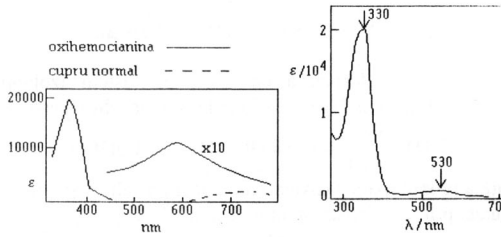


Figura VI.23. Spectrele UV-VIS ale oxihemocianinei și LCuO-OCuL.

Biometalele au rol frecvent de coenzime sau de așa-numite grupări prostetice. Coenzima este o porțiune de enzimă care se desprinde ușor. Porțiunea care rămâne este de obicei inactivă și se numește apoenzimă :

enzimă ⇌ coenzimă + apoenzimă

Trebuie să menționăm că ionii metalici joacă un rol excepțional în procesele catalitice enzimatice (în biocataliză), cu toate că este cunoscut un număr foarte mare de enzime în structura cărora nu intră ionii metalici.

Reacțiile biocatalitice studiate se pot împărți în două mari grupe:

— reacțiile hidrolitice ;

— reacțiile de oxido-reducere, printre care se află și reacțiile de fixare a azotului atmosferic (dinitrogenul).

În structura enzimelor care catalizează reacțiile hidrolitice intră ionii metalici : Ca^{+2}, Mg^{+2}, Zn^{+2}, Mn^{+2}. Enzimele care catalizează procesele redox pot conține Fe, Co, Cu și Mo. Ultima grupă de enzime este mai numeroasă și mai importantă pentru procesele vieții.

METALOENZIME, CATALIZATORI AI PROCESELOR HIDROLITICE

În timpul desfășurării proceselor hidrolitice, în organismele vii, nu are loc transferul electronilor și modificarea gradului de oxidare a atomilor, respectiv ionilor substratului. Acesta este motivul pentru care metaloenzimele catalizatori ai acestui tip de reacții includ în structura lor, biometale care se caracterizează printr-un grad de oxidare constant: Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+} și foarte rar un ion metalic în care metalul își poate modifica gradul de oxidare, cum ar fi Mn^{2+}.

Cel mai simplu proces care este catalizat de metaloenzimele din acest grup este procesul de transformare al CO_2-ului în ionul HCO_3^- sau procesul opus :

$$CO_2 + HO^- \rightleftharpoons HCO_3^- \qquad \text{(VII.1)}$$

$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \qquad \text{(VII.2)}$$

Reacțiile VII.1 și VII.2 pot decurge și necatalizate, cu viteză mică, dar condițiile în care au loc procesele vieții necesită accelerarea lor.

Să luăm de exemplu, ionul de zinc în carboanhidrază. Această enzimă catalizează acest echilibru care altfel decurge lent. Este ușor de demonstrat experimental această cinetică lentă. Saturăm apa dintr-o incintă în dioxid de carbon, cu zăpadă carbonică și adăugăm o picătură de albastru de bromtimol. Din cauza aciditătii H_2CO_3 soluția este colorată în galben. Dacă se adaugă o picătură de NaOH concentrat, sub agitare, soluția devine imediat albastră. Ionii HO^- sunt neutralizați instantaneu de H_2CO_3. În timp, soluția devine galbenă : H_2CO_3 se reformează, plecând de la CO_2-ul dizolvat, ceea ce duce la o creștere suficientă a aciditătii, ca soluția să redevină colorată în galben. Evident, dacă NaOH este adăugat într-o astfel de cantitate ca tot CO_2- ul dizolvat să fie neutralizat, soluția rămâne definitiv albastră. Viteza mică a acestui echilibru este un obstacol important la schimburile de CO_2 între sânge și aer, care se petrec în organismele vii.

Dacă în experiența precedentă, soluției saturate în CO_2 i se adaugă anhidridă carbonică soluția rămâne galbenă la adăugarea de NaOH și nu devine albastră decât la neutralizare. Echilibrul în discuție este ajustat în mod constant.

Accelerarea acestei reacţii, în lumea vie se obţine prin cataliza ei cu o enzimă care conţine Zn şi este denumită *carboanhidrază*. Această enzimă se prezintă în trei forme şi are o masă moleculară de ordinul 30000. În structura ei intră 259 de resturi de aminoacizi . Forma macromoleculei de *carboanhidrază* este aproximativ elipsoidală cu dimensiunile 40*45*55 Å. În macromolecula metaloenzimei se află un gol destul de adânc , a cărui parte exterioară conţine grupările hidrofobe ale resturilor de aminoacizi. În interiorul golului se află ionul de Zn^{2+} legat cu trei resturi de histidină prin grupările imidazolice ale acesteia . Al patrulea centru de coordinare este ocupat posibil, de o moleculă de apă printr-o pereche de electroni neparticipanţi ai atomului de oxigen sau de către ionul HO^-.

Structura *carboanhidrazei* determinată prin studii cu raze X (analiză de difracţie), caracteristică organismului omenesc, este prezentată în figura VII.1.

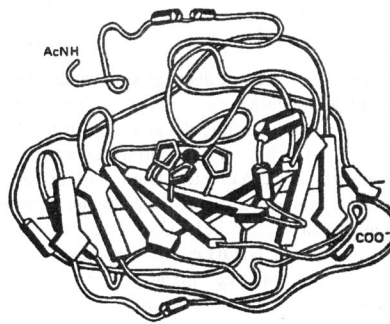


Figura VII.1. Schema structurii carboanhidrazei umane. S-a reprezentat centrul activ format dintr-un atom de zinc şi trei grupe de histidină.

Se observă că ionul de zinc este plasat în centrul proteinei formate din cei 259 aminoacizi. Determinările de structură au confirmat că centrul catalitic este format din ionul de zinc, înconjurat de trei grupări imidazol, care provin de la trei molecule de histidină şi de o moleculă de apă, aşa cum s-a presupus anterior.

Ionul de Zn^{2+} poate fi substituit în *carboanhidrază* ,cu ioni de Co^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Pb^{2+}, Fe^{2+}, Be^{2+}, Mg^{2+} şi Ca^{2+}. La substituirea Zn cu Co enzima îşi păstrează activitatea înaltă, iar la substituirea cu ioni de Ni şi Mn activitatea scade; în alte cazuri activitatea catalitică dispare. *Carboanhidraza* poate cataliza reacţia de hidratare a unor aldehide când îşi manifestă o activitate de *esterază*.

La substituirea ionilor de Zn cu ioni de Co activitatea catalitică a enzimei se măreşte ceea ce duce la concluzia că ambii ioni se coordinează într-un mod asemănător şi au aproximativ unele şi aceleaşi caracteristici pentru compuşii coordinativi corespunzători.

Investigarea spectrului de absorbţie al *Co^{2+}-carboanhidrazei* a arătat că, coordinarea ionilor de Co^{2+} este caracterizată de o simetrie tetraedrică foarte deformată şi spectrele de absorbţie investigate se aseamănă cu spectrele de absorbţie ale ionilor Co^{2+} care coordinează 4 molecule de benzimidazol situate în vârfurile unui tetraedru, utilizat drept compus model.

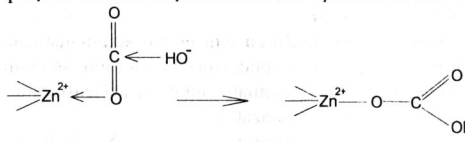
Faptul că simetria complexului enzimatic este destul de scăzută este un fenomen obişnuit în compuşii coordinativi naturali implicaţi în procesele vieţii. Se presupune că în enzime, ionul metalic formează cu atomii apropiaţi aşa-numita structură "entatică", adică o structură tensionată şi nestabilă, deosebit de reactivă. Din acest motiv metaloenzimele au o activitate catalitică deosebit de mare.

Pentru enzima dată este caracteristic un număr de inhibitori care conţin grupări aminice, care sunt capabili să o dezactiveze . Din aceşti inhibitori fac parte anionii N_3^-, NC^-, CNO^-, $S_2O_4^{2-}$ şi moleculele de sulfamide : $X\text{-}SO_2\text{-}NH_2$. Aceşti anioni dezactivează şi carboanhidraza modificată cu ioni de Co^{2+}, respectiv Co^{2+}-carboanhidraza. Spectrele de absorbţie în domeniul ultraviolet-vizibil ale enzimelor care conţin ioni de Co se modifică la adăugarea inhibitorilor. Din aceste modificări, se poate trage concluzia că ionul de Co^{2+} îşi menţine coordinarea tetraedrică dar unul din centrii de coordinare este ocupat de către inhibitor. Spectrele de vibraţie ale inhibitorilor se modifică mult la coordinare.

La intrarea moleculei de CO_2 în golul macromoleculei enzimei (în centrul activ), spectrul său în domeniul infraroşu nu se modifică suficient de mult pentru a putea fi interpretabil, ceea ce indică că nu are loc coordinarea CO_2-ului cu ionul metalic. O confirmare suplimentară a absenţei coordinării moleculei de CO_2 poate fi absenţa modificărilor în spectrele de absorbţie ale enzimei care conţine Co .

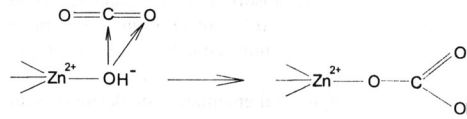
Ionul HCO_3^- (bicarbonat) care se formează în timpul reacției VII.1 se coordinează cu ionii de Zn^{2+} și Co^{2+} .

Cel mai posibil mecanism al reacției VII.1 este un mecanism de coordinare în timpul căruia molecula de CO_2 este atacată simultan din ambele părți de doi reactanți : ionul de Zn^{2+} și ionul de HO^- :



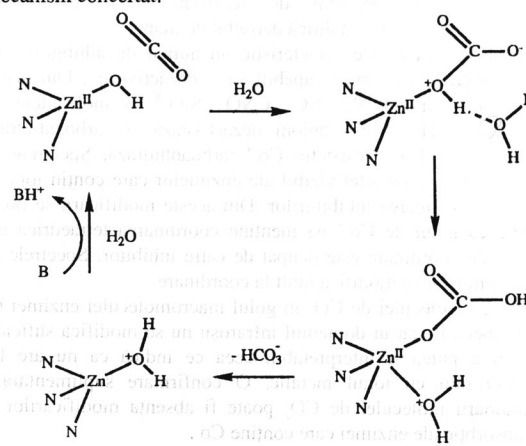
(VII.3)

Există și o altă posibilitate de formare a ionului carbonat acid în centrul catalitic :



(VII.4)

În prezent, pe baza cercetărilor efectuate s-a arătat că cele două mecanisme nu elucidează complet tipul de interacțiune, astăzi fiind propus următorul mecanism concertat:



(VII.5)

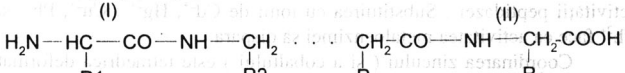
Imidazolul s-a reprezentat numai prin atomul său de azot legat de ionul de zinc. Prima etapă va fi atacul unui ion hidroxo (HO^-) asupra moleculei de CO_2, care după transferul protonului va da HCO_3^- pentru a lăsa o moleculă de apă legată de ionul metalic. O bază, care ar putea fi o histidină vecină centrului activ, va capta protonul pentru a reda ionul hidroxil legat de metal. De aici se observă cât de important este rolul metalului dar şi cum grupele vecine pot participa la actul catalitic. Un astfel de exemplu este foarte dificil de reprodus în laborator şi necesită realizarea unei structuri moleculare relativ complexe; se poate imagina construcţia unei "cavităţi" organice care reţine apropiaţi unul de altul ionul metalic şi gruparea activă în transferul de protoni.

Există o asemănare între reacţia discutată (VII.1) şi numeroasele reacţii de hidroliză ale peptidelor. Unele enzime catalizatori ale reacţiilor de hidroliză ale legăturilor peptidice din peptide sunt prezentate în tabelul VII.1 .

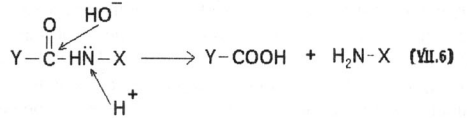
Tabelul VII.1. Unele enzime catalizatori ai reacţiilor de hidroliză a peptidelor

Reacţia	Enzima	Biometalul care intră în structura enzimei	Masa moleculara
Hidroliza la atomul de C din ultimul rest de peptidă	Carboxipeptidaza	Zn^{2+}	34600
Hidroliza la atomul de N din ultimul rest de peptidă	Aminopeptidaza	Mg^{2+} (Mn^{2+}) Zn^{2+}	400000
Hidroliza dipeptidelor	Dipeptidaza	Zn^{2+}	47200
Hidroliza pentidelor	Proteaza	Ca^{2+}	-

La hidroliza legăturii peptidice din structura macromoleculelor biologice cum ar fi polipeptidele, are loc reacţia de rupere a unei legături chimice din gruparea peptidică :



Sub acţiunea *carboxipeptidazei* se hidrolizează gruparea peptidică (I) , iar *aminopeptidaza* facilitează hidroliza grupării peptidice (II) . Alte enzime pot însă cataliza hidroliza tuturor grupărilor peptidice . Toate reacţiile menţionate anterior decurg conform schemei (VII.6) :



(VII.6)

O enzimă mai mult studiată din acest grup este *carboxipeptidaza*. Există o asemănare foarte mare între această enzimă şi *carboanhidrază*: masele moleculare apropiate, forma aproximativ elipsoidală a macromoleculei (dimensiunile molului sunt de 32*48*50 Å), prezenţa golului format din resturile hidrofobe de aminoacizi, prezenţa atomului de Zn coordinat tetraedric în interiorul golului, etc.

Spre deosebire de *carboanhidrază,* în *carboxipeptidază* ionul de zinc este legat cu numai două grupări imidazol din histidină, al treilea centru fiind ocupat de restul glutaminei, iar al patrulea de molecula de apă, ce poate fi substituită cu molecula substratului în timpul reacţiei enzimatice. Substratul se leagă cu ionul de zinc prin gruparea >C=O a legăturii peptidice , iar gruparea - COO^- a peptidei fiind legată cu gruparea guanidină a argininei care intră în structura metaloproteinei .

La intrarea substratului în golul enzimei pot fi observate unele modificări conformaţionale în macromolecula proteinei - rotirea grupării C_6H_4OH a tirozinei în interiorul golului enzimei.

Carboxipeptidaza este o enzimă foarte studiată . Cu ajutorul analizei prin raze X a fost stabilită prezenţa a patru forme de *carboxipeptidază* (α , β , γ şi δ) şi a mai fost stabilit că numărul aminoacizilor care intră în structura enzimei este de 300 - 307 , în funcţie de tipul *carboxipeptidazei*.

Ionul de Zn^{2+} în *carboxipeptidază* poate fi substituit cu ionul de Ca^{2+}. În acest caz se observă creşterea activităţii metaloenzimei . Substituirea ionilor de Zn^{2+} cu ionii de Ni^{2+}, Mn^{2+} sau Fe^{2+} duce la scăderea activităţii peptidazei . Substituirea cu ionii de Cd^{2+}, Hg^{2+} , Cu^{2+}, Pb^{2+} sau Rh^{2+} face ca activitatea metaloenzimei să dispară.

Coordinarea zincului (şi a cobaltului) este tetraedrică deformată. Acest fapt poate fi confirmat cu ajutorul spectrelor de absorbţie ale Co-*carboxipeptidazei* şi prin prezenţa efectului Cotton pronunţat. Aşa cum

au arătat investigările prin spectroscopie RMN ale *carboxipeptidazei* cu Mn (II) în loc de Zn (II) în centrul activ, molecula de apă coordinată este foarte mobilă şi poate fi substituită la intrarea moleculei substratului în golul enzimei.

Mecanismul de reacţie al hidrolizei legăturii peptidice cu participarea *carboxipeptidazei* nu este până în prezent elucidat. Există două presupuneri. Una din ele constă în aceea că gruparea C=O a legăturii peptidice este coordinată cu ionul de Zn^{2+}, iar atomul de carbon din această grupare polarizat pozitiv, reţine gruparea -OH din molecula de apă. A doua presupunere constă în aceea că ionul HO- se leagă de atomul de carbon al grupării -C=O peptidice care iniţial a fost coordinată cu ionul de Zn^{2+}.

Hidroliza grupărilor peptidice care sunt situate în apropierea grupării aminice finale, de la capătul lanţului macromolecular, are loc cu participarea *aminopeptidazelor* care prezintă o selectivitate mare cu privire la structura resturilor de aminoacizi terminali. *Aminopeptidazele* sunt caracterizate printr-o masă moleculară destul de mare de 400000 de mii, cu un conţinut mare în metal de până la 20 de atomi/un mol de enzimă. Dintre metale au fost identificate: magneziul, manganul, zincul şi uneori calciul.

La hidroliza dipeptidelor participă *dipeptidaza,* care se caracterizează printr-o masă moleculară relativ mică de 47000 de mii şi prin prezenţa ionilor de Zn^{2+} în calitate de coenzimă. Alte metaloenzime care catalizează reacţiile de hidroliză a legăturii peptidice, posedă în structura lor ioni de Ca^{2+} şi uneori alţi ioni metalici.

Sunt cunoscute numeroase enzime, catalizatori ai reacţiilor de hidroliză a grupărilor esterice din macromoleculele biologice, deosebit de importante în procesele vieţii fiind hidrolizele grupărilor fosfat.Aceste enzime sunt denumite fosfataze şi sunt prezentate în tabelul VII.2.

Metaloenzimele cu structură asemănătoare pot cataliza şi reacţiile de transfer ale grupării PO_3^- adică reacţii de tipul:

$$ATP^{4-} + XH \rightleftharpoons ADP^{3-} + XPO_3 + H^+ \qquad \text{(VII.7)}$$

Enzimele care catalizează reacţiile de transfer ale grupărilor de la un substrat la altul sunt cunoscute sub denumirea de *chinaze.* În prezent sunt cunoscute aproape 100 de chinaze care pot cataliza procesul dat. În structura fiecăreia din ele este prezent ionul de Mg^{2+} care prin diferite reacţii pot fi substituiţi cu ioni de Mn^{2+}, cu păstrarea activităţii enzimatice.

Tabelul VII.2. Unele enzime catalizatori ai hidrolizei legăturilor esterice

Reacția	Enzima	Biometalele	Masa moleculei
$P_2O_7^{4-} + H_2O = 2\ HPO_4^{2-}$	Pirofosfataza	Mg^{2+}	-
$ATP + H_2O = ADP + H_2PO_4^-$	ATP-aza	Mg^{2+}	-
Fosfat de hidrat de C + H_2O = hidrat de C + HPO_4^{2-}	Fosfataza	Mg^{2+}	-
Diferiți esteri fosforici + HO^-	Fosfataza alcalină	Zn^{2+}	89.000
Fosfolipide + H_2O	Fosfolipaza C	-	-
Glucozidă + H_2O	α-amilaza	Ca^{2+} (Zn^{2+})	50.000

Introducerea ionului Mn^{2+} permite utilizarea metodelor spectroscopiei RPE și RMN pentru investigarea structurii compușilor de coordinație intermediari, a cineticii și a mecanismului de reacție care implică participarea enzimelor. În astfel de situații pot să se formeze cel puțin două tipuri de complecși intermediari M - S - E și S - M - E, unde E este enzima, M este ionul metalic iar S este substratul (substratul poate fi ATP^{4-} și ATP^{3-}).

În primul tip de compuși de coordinație rolul ionului metalic se reduce la neutralizarea sarcinii electrice a substratului. In calitate de biometal pot funcționa diferite metale și cataliza reacției în acest caz nu este specifică.

In al doilea caz cataliza este specifică cu privire la ionii metalici: numai un număr redus de biocationi formează centri activi catalitici de tip M - E.

Dintre enzimele acestui grup, cea mai studiată este *fosfataza bazică* care catalizează numeroasele reacții de hidroliză a esterilor acidului H_3PO_4. Masa moleculară a enzimei este 89000, pe un mol de enzimă existând 4 ioni de Zn. Cu scăderea pH-ului soluției de metaloenzimă, are loc descompunerea soluției de fosfatază bazică, în două subunități. Structura inițială se restabilește cu creșterea pH-ului soluției sau la adăugarea ionului de Zn^{2+}.

Presupunerea că ionii de zinc nu mai leagă două subunități în dimer cade, din cauză că, la adăugarea în mediu a o-fenantrolinei, fosfataza bazică se dezactivează complet. Activitatea fosfatazei bazice se menține și la adăugarea ionilor dipozitivi de Hg^{2+} și Co^{2+}. La substituirea Zn cu Co se

menţine 10% din activitatea de cataliză hidrolitică, dar dispare complet activitatea de *transferază.*

La introducerea în molecula apoenzimei a doi ioni de cobalt, în spectrul electronic, apar benzi de absorbţie caracteristice pentru ionul de Co^{2+} cu coordinare octaedrică (simetrie Oh), dar enzima rămîne inactivă. Se presupune că aceşti doi ioni de Co^{2+} sau Zn^{2+} joacă rolul ionilor care conservă structura enzimei, fixând unele conformaţii ale resturilor de aminoacizi.

La introducerea a încă doi ioni de Co^{2+} în apoenzimă se observă că în spectrele de absorbţie în domeniile spectrale ultraviolet-vizibil, apar benzi caracteristice pentru coordinarea tetraedrică, puternic deformată, a ionilor de Co^{2+} care se găsesc probabil plasaţi, în centrele active ale *fosfatazei bazice.* Aceste observaţii sunt confirmate experimental şi de prezenţa efectului Cotton foarte bine pronunţat în spectrele compusului studiat.

Pentru un număr foarte important de procese biologice, de mare importanţă este reacţia de hidroliză a *adenozintrifosfatului* (ATP) :

$$ATP^{4-} + H_2O \rightleftharpoons ADP^{3-} + H_2PO_4^- \qquad \text{(VII.8)}$$

Această reacţie este acompaniată de degajarea unei cantităţi de energie strict determinate.

Reacţia este catalizată de ionii mai multor metale : Be^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+}. Interesant este faptul că ionii de Mg^{2+} şi Ba^{2+} nu catalizează această reacţie. Activitatea catalitică a ionilor depinde de pH-ul soluţiei : la pH = 5 activitatea cea mai mare o prezintă ionii de Cu^{2+}şi Zn^{2+}, iar la pH = 2 activitatea cea mai mare o prezintă ionii de Ca^{2+} şi Mn^{2+}.

Din studiul datelor de literatură se poate trage concluzia că activitate catalitică prezintă numai sistemele metaloenzimatice, deoarece biocationii respectivi introduşi în mediu (cationii simpli), în cel mai bun caz, pot mări viteza de reacţie de 10 până la 60 ori.

O altă enzimă care catalizează reacţii de hidroliză în organismele vii este *α-amilaza* care catalizează reacţia de hidroliză a glicozidelor. *α-amilaza* este o metaloproteină cu masa moleculară de ordinul 50000 ce conţine unu sau doi ioni dipozitivi de Ca care stabilizează structura enzimei şi unu până la doi ioni dipozitivi de Zn, care determină structura de dimer a enzimei.

REACŢII CU TRANSFER DE ELECTRONI

Reacţiile cu transfer de electroni sunt deosebit de importante în procesele de fotosinteză şi respiraţie. Cuplarea acestor reacţii cu schimburile de protoni, la traversarea membranei biologice permite fosforilarea ADP-ului în ATP.

În acest capitol vom prezenta reacţiile cu transfer de electroni precum şi proteinele implicate în aceste reacţii.

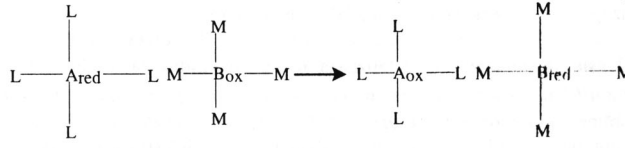
VIII.1. Teoria transferului de electroni

O reacţie cu transfer de electroni poate fi reprezentată astfel:

$$A_{red} + B_{ox} \rightarrow A_{ox} + B_{red}$$

Teoria lui Marcus furnizează un anumit număr de puncte de reper pentru înţelegerea acestor reacţii.

Într-o manieră generală, putem presupune că transferul unui electron este însoţit de reorganizarea nucleelor. Dacă centrul activ este oxidat, are loc contracţia distanţelor între acest centru activ şi nucleele ce îl înconjoară.



Presupunem că entalpia liberă a sistemului variază armonic în funcţie de mişcarea acestor nuclee. Sistemul va fi reprezentat de un punct situat pe una din cele două curbe ale figurii VIII.1.

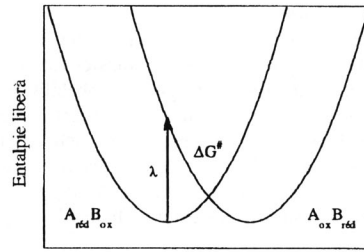


Figura VIII.1. Entalpia liberă a unei perechi redox AB în funcţie de mişcarea nucleelor.

ΔG^0 reprezintă variaţia entalpiei libere a reacţiei (aici presupusă egală cu zero), iar λ este entalpia liberă de reorganizare a vecinătăţii lui A şi B în timpul transferului. Semnificaţia fizică a acestui termen este următoarea: să presupunem că $\Delta G^0 = 0$, caz în care cele două curbe au energie minimă. Să plasăm sistemul în minimul curbei $A_{red}B_{ox}$ şi să ne imaginăm că electronul este transferat instantaneu de la A la B: aceasta corespunde în figura VIII.1 la o tranziţie verticală. Sistemul va fi în starea $A_{ox}B_{red}$ excitată pentru că nucleele şi-au păstrat poziţia de echilibru adaptată la starea $A_{red}B_{ox}$. Energia pe care sistemul trebuie să o piardă prin reorganizarea poziţiei nucleelor în starea $A_{ox}B_{red}$ este exact λ. Se înţelege că λ depinde de diferenţa între poziţiile de echilibru a nucleelor: dacă poziţiile nucleelor sunt foarte puţin sensibile cu starea de oxidare ale lui A şi B, parabolele vor fi foarte apropiate şi λ va fi mic; invers dacă poziţiile nucleelor sunt foarte sensibile la stările de oxidare ale lui A şi B, parabolele vor fi separate net şi atunci λ va fi foarte mare.

În cazul vibraţiilor sistemului $L_nA_{red}B_{ox}M_n$, punctul caracteristic al sistemului se deplasează pe curba notată $A_{red}B_{ox}$; acelaşi lucru se întâmplă şi în cadrul sistemului $A_{ox}B_{red}$. Dacă punctul caracteristic atinge punctul de intersecţie al celor două curbe, poate avea loc trecerea de la o curbă la alta (a se vedea în continuare): atunci are loc transferul electronului de la A la B.

Se vede că această descriere corespunde unui transfer activat termic cu o entalpie liberă de activare $\Delta G^{\#}$.

La temperatură joasă punctul caracteristic al sistemului este pe fundul unei parabole şi probabilitatea de transfer este nulă. Din punct de vedere cantitativ acest lucru nu este riguros: probabilitatea de trecere de la o stare la alta nu este nulă datorită unui efect tunel nuclear. Avem deci o viteză a transferului de electroni independentă de temperatură.

Foarte riguros, dacă la punctul de intersecţie a două parabole din figura VIII.2 nu există amestecarea stărilor $A_{red}B_{ox}$ şi $A_{ox}B_{red}$, adică dacă punctul de intersecţie este cel prezentat în figura VIII.1, probabilitatea de transfer este nulă.

Pentru a avea o probabilitate nenulă, trebuie ca să existe amestecarea stărilor $A_{red}B_{ox}$ şi $A_{ox}B_{red}$. Acest amestec este datorat existenţei unei interacţiuni V_{12} între aceste stări. Vom avea atunci la "punctul de intersecţie" următoarea situaţie:

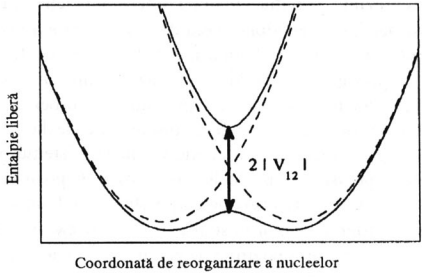


Figura VIII.2. Situaţia amestecării stărilor $A_{red}B_{ox}$ şi $A_{ox}B_{red}$ la punctul de intersecţie.

Dacă $|V_{12}| >> 100\ cm^{-1}$, curbele sunt suficient de separate astfel încât punctul caracteristic al sistemului rămâne pe curba inferioară; probabilitatea de transfer se apropie de unitate: discutăm despre o reacţie adiabatică.

Dacă $|V_{12}| << 100\ cm^{-1}$, curbele sunt suficient de apropiate pentru ca punctul caracteristic sistemului să treacă de la una la alta; probabilitatea ca el să rămână pe curba inferioară este mică: se vorbeşte despre o reacţie

neadiabatică. Trebuie remarcat că acest cuvânt este format dintr-o dublă negație ceea ce ar putea crea o oarecare confuzie; din acest motiv s-a propus termenul de diabatic.

Marcus a propus pentru reacțiile adiabatice o tratare semiclasică care pentru constanta de viteză a transferului electronului (k_{te}) este o relație de tipul:

$$k_{te} = A \exp\left(-\frac{\Delta G^{\#}}{RT}\right)$$

VIII.1.1. Influența lui ΔG^0 asupra entalpiei libere de activare a unei reacții adiabatice. Relația încrucișată a lui Marcus

Am considerat o energie de reorganizare λ constantă: cele două parabole vor fi deplasate în tot calculul care urmează de o cantitate constantă. Să considerăm mai întâi $\Delta G^0 = 0$; ținând cont de caracterul parabolic și presupunând că cele două parabole au aceeași curbură se găsește ușor că: $\Delta G^{\#} = \frac{\lambda}{4}$.

Trebuie remarcat aici că, în această teorie, cu presupunerea că V_{12} este destul de important ca reacția să fie adiabatică, i-am neglijat efectul asupra lui $\Delta G^{\#}$.

Întrebarea pe care ne-o vom pune este influența lui ΔG^0 asupra lui $\Delta G^{\#}$. Este evident că dacă ΔG^0 este negativ a doua parabolă se va deplasa în jos și $\Delta G^{\#}$ se va diminua corespunzător. Să cuantificăm acest efect: ecuația primei parabole este $\Delta G_1 = ax^2$ în reperul convenabil, a reprezintă constanta de armonicitate și x reprezintă o coordonată care caracterizează poziția nucleului.

A doua parabolă se caracterizează prin ecuația (minimul în x_λ):

$$\Delta G_2 = ax^2 + bx + c.$$

În $x_{\#}$ avem $\Delta G_1 = \Delta G_2$, adică $bx_{\#} + c = 0$, de unde $x_{\#} = -\frac{c}{b}$. Dar, $c = \lambda + \Delta G^0$ și $b = -2ax_\lambda$. De aici rezultă :

$$x_{\#} = \frac{\lambda + \Delta G^0}{2ax_\lambda}$$

ceea ce în final conduce la :

$$\Delta G^{\#} = ax_{\#}^2 = a\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{(2ax_\lambda)^2} = \frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4ax_\lambda^2} = \frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda}$$

Regăsim astfel că pentru o reacţie exergonică entalpia liberă de activare trebuie să fie diminuată; până la o anumită limită , pentru $\Delta G^0 = -\lambda$, energia de activare se anulează, dar după aceea ea creşte din nou. Pentru reacţii endergonice, entalpia liberă de activare creşte. Aceste comportamente sunt rezumate în figura VIII.3.

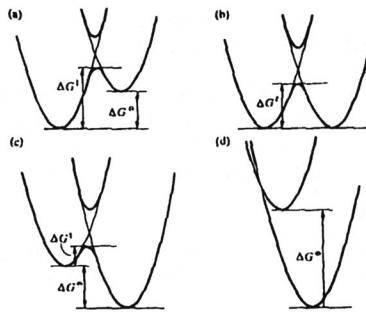


Figura VIII.3. Influenţa entalpiei libere ΔG^0 a unei reacţii redox asupra entalpiei libere de activare $\Delta G^{\#}$ a acestei reacţii.

Din punct de vedere fizic această relaţie semnifică că pentru o energie de reorganizare constantă, reacţia redox cea mai exergonică va fi cea mai rapidă până la o anumită limită, după care o creştere de exergonicitate va fi însoţită de o creştere a lui $\Delta G^{\#}$. Când acest ultim fenomen se produce, se spune că reacţia este în regimul "invers".

Marcus a utilizat această relaţie pentru a deduce o alta privind constanta de viteză.

Vom rescrie relaţia precedentă sub forma:

$$\Delta G^{\#} = \frac{\lambda}{4} + \frac{\Delta G^0}{2} + \frac{(\Delta G^0)^2}{4\lambda}$$

Mai sus s-a menţionat că $\lambda/4$ este energia de activare a unei reacţii cu entalpie liberă nulă. Această cantitate poate să fie legată de o constantă de viteză . ΔG^0 poate să fie legată de constanta de echilibru K_{AB} a reacţiei studiate.

Utilizând un atom marcat, radioactiv, se poate studia reacţia:

$$A_{red} + A^*_{ox} \rightarrow A_{ox} + A^*_{red}$$

În acelaşi mod,

$$B_{red} + B^*_{ox} \rightarrow B_{ox} + B^*_{red}$$

Pentru aceste două reacţii, $\Delta G^0 = 0$. Dar fiecare din reacţii are o constantă de viteză k_{AA} sau k_{BB} care în cadrul teoretic în care lucrăm are ca energie de activare $\lambda_{AA}/4$ sau $\lambda_{BB}/4$. Se admite că pentru reacţia iniţială parametrul de reorganizare este apropriat de media $\lambda = (\lambda_{AA}/4 + \lambda_{BB}/4)2$.

Cu aceste ipoteze putem scrie :

$$\Delta G^{\#} = \frac{\Delta G^{\#}_{AA} + \Delta G^{\#}_{BB}}{2} + \frac{\Delta G^0}{2} + \frac{(\Delta G^0)^2}{4\lambda}$$

fie

$$\exp\left(-\frac{\Delta G^{\#}}{RT}\right) = \exp\left[-\frac{\Delta G^{\#}_{AA} + \Delta G^{\#}_{BB}}{2RT}\right].\exp\left[-\frac{\Delta G^0}{2RT}\right].\exp\left[\frac{(\Delta G^0)^2}{4\lambda RT}\right]$$

Presupunând că factorul A este acelaşi pentru aceste trei reacţii, avem relaţia "încrucişată " a lui Marcus:

$$k_{AB} = \left[k_{AA}k_{BB}K_{AB}f_{AB}\right]^{1/2} \text{ cu } f^{1/2}_{AB} = \left[-\frac{(\Delta G^0)^2}{4\lambda RT}\right]$$

Este uşor de verificat că f_{AB} poate fi exprimat în felul următor, plecând de la constantele de viteză şi de echilibru:

$$\ln f_{AB} = \frac{(\ln K_{AB})^2}{4\ln\frac{k_{AA}k_{BB}}{A^2}}$$, A este în jur (aproximativ egală) cu $10^{11} M^{-1} s^{-1}$

O serie de reacţii cu transfer de electroni, la $\Delta G^0 = 0$ şi anumiţi parametri asociaţi sunt indicate în tabelul VIII.1.

Tabelul VIII.1. Reacţii cu transfer de electroni la $\Delta G = 0$, cu parametrii de reacţie corespunzători.

Cuplul	k_{obs} ($M^{-1}s^{-1}$)	Δd_0 (Å)	r (Å)
$[Fe(H_2O)_6]^{3+} / [Fe(H_2O)_6]^{2+}$	4,2	0,14	6,5
$[Ru(H_2O)_6]^{3+} / [Ru(H_2O)_6]^{2+}$	10^2	0,009	6,5
$[Ru(NH_3)_6]^{3+} / [Ru(NH_3)_6]^{2+}$	$3x10^3$	0,004	6,7
$[Ru(bpy)_3]^{3+} / [Ru(bpy)_3]^{2+}$	$4x10^8$	0,00	13,6
$[Co(NH_3)_6]^{3+} / [Co(NH_3)_6]^{2+}$	$\geq 10^{-7}$	0,22	6,6
$[Co(bpy)_3]^{3+} / [Co(bpy)_3]^{2+}$	18	0,19	13,6

Δd_0 corespunde variaţiei poziţiei de echilibru a sferelor de coordinare când gradul de oxidare al metalului variază, iar r indică separarea (distanţa) medie metal-metal în timpul reacţiei de transfer a electronului: în acest tabel r este egal cu suma sferelor corespunzătoare fiecărui reactiv.

Energia de reorganizare λ este cu atât mai mare cu cât Δd_0 este mai mare (conform cu cele prezentate în tabel) şi r este mai mic. În ce priveşte primul parametru, se consideră că cu cât sistemul format din cei doi reactivi este mai mic, cu atât moleculele de solvent se reorganizează în timpul transferului.

Se înţelege deci că pentru un ligand dat, viteza de transfer este cu atât mai mare cu cât Δd_0 este mai mic şi că pentru un metal dat, aceeaşi viteză este cu atât mai mare cu cât r este mai mare.

Pornind de la aceste constate de viteză pentru a calcula pe cele ale reacţiilor compozite (eterogene) cu condiţia ca să se cunoască constantele de echilibru ale acestora din urmă. Astfel pentru reacţia :

$$\left[Ru(NH_3)_6\right]^{2+} + Fe^{3+}_{aq} \rightarrow \left[Ru(NH_3)_6\right]^{3+} + Fe^{2+}_{aq} \qquad K_{AB} = 10^{11.23}$$

putem calcula (toate pentru 25°C) $k_{AB} = 2.10^6$ comparativ cu $k_{AB}(exp) = 3.4.10^5$ (a se vedea punctul nr 10 din figura VIII.4).

Acordul este în general înţeles bine, dacă ţinem cont de simplitatea modelului şi de intervalul numeric al valorilor interpretate (între 10^{-4} şi

10^8). Figura VIII.4 reprezintă un grafic logaritmic a lui k_{AB} calculată în funcţie de k_{AB} observată experimental.

Reacţiile descrise corect de această teorie sunt denumite reacţii prin sfera externă: sferele de coordinaţie nu se interpenetrează; cel mult ele sunt "tangente" una la alta în momentul transferului.

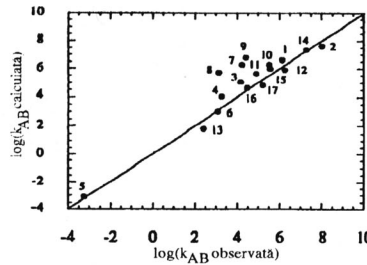


Figura VIII.4. Graficul lui $\log(k_{AB}$ calculată) în funcţie de $\log(k_{AB}$ observată) în cadrul teoriei lui Marcus.

Alte valori comparative sunt prezentate în tabelul VIII.2. Dezacordurile experienţă-teorie sunt instructive: ele traduc (reprezintă) în general faptul că reacţiile reale au loc prin alte mecanisme. Este cazul aquocomplecşilor pe bază de fer (punctele numărul 7,8,9,10,11). Aceste reacţii sunt poate reacţii redox prin sfera interioară: un ligand în punte între cele două metale şi electronul este transferat via acest ligand.

Mecanismul general al acestor reacţii este următorul:

1) formarea speciei în punte

$$M(II)L_6 + XM'(III)L'_5 \rightarrow L_5M(II)—X—M'(III)L'_5 + L$$

2) transferul electronului

$$L_5M(II)—X—M'(III)L'_5 \rightarrow L_5M(III)—X—M'(II)L'_5$$

3) evoluţia spre produşi

$$L_5M(III)—X—M'(II)L'_5 \rightarrow \text{produşi}$$

Un exemplu foarte studiat este

$$\left[Co(NH_3)_5Cl\right]^{2+} + Cr^{2+}_{aq} \rightarrow Co^{2+}_{aq} + CrCl^{2+}_{aq}$$

care trece prin intermediarul: $(NH_3)_5Co(III)—Cl—Cr(II)(H_2O)_5$.

Compusul de coordinație $(NH_3)_5Co(II)(H_2O)$ nu este stabil și se descompune în Co^{2+}_{aq}.

Tabelul VIII.2. Valorile comparative ale constantelor de viteză observate și calculate ale reacțiilor redox cu participarea ionilor complecși.

Numărul corespunzător din figură	Reacția	log K_{AB}	$k_{AB,obs}$ ($M^{-1}s^{-1}$)	$k_{AB,calc}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
1	$Ru(NH_3)_6^{2+} + Ru(NH_3)_5py^{3+}$	4.40	$1.4\ 10^6$	$4\ 10^6$
2	$Ru(NH_3)_5py^{2+} + Ru(NH_3)_4bipy^{3+}$	3.39	$1.1\ 10^8$	$4\ 10^7$
3	$Ru(NH_3)_6^{2+} + Co(phen)_3^{3+}$	5.42	$1.5\ 10^4$	$1\ 10^5$
4	$Ru(NH_3)_5py^{2+} + Co(phen)_3^{3+}$	1.01	$2.0\ 10^3$	$1\ 10^4$
5	$V^{2+}_{aq} + Co(en)_3^{3+}$	0.25	$5.8\ 10^{-4}$	$7\ 10^{-4}$
6	$V^{2+}_{aq} + Ru(NH_3)_6^{3+}$	5.19	$1.3\ 10^3$	$1\ 10^4$
7	$V^{2+}_{aq} + Fe^{3+}_{aq}$	16.90	$1.8\ 10^4$	$2\ 10^6$
8	$Fe^{2+}_{aq} + Os(bipy)_3^{3+}$	1.53	$1.4\ 10^3$	$5\ 10^5$
9	$Fe^{2+}_{aq} + Fe(bipy)_3^{3+}$	3.90	$2.7\ 10^4$	$6\ 10^6$
10	$Ru(NH_3)_6^{2+} + Fe^{3+}_{aq}$	11.23	$3.4\ 10^5$	$2\ 10^6$
11	$Ru(en)_3^{2+} + Fe^{3+}_{aq}$	9.40	$8.4\ 10^4$	$4\ 10^5$
12	$Mo(CN)_8^{4-} + IrCl_6^{2-}$	2.18	$1.9\ 10^6$	$8\ 10^5$
13	$Mo(CN)_8^{4-} + MnO_4^-$	-4.07	$2.7\ 10^2$	$6\ 10^1$
14	$Mo(CN)_8^{4-} + HMnO_4$	8.48	$1.9\ 10^7$	$2\ 10^7$
15	$Fe(CN)_6^{4-} + IrCl_6^{2-}$	4.08	$3.8\ 10^5$	$1\ 10^6$
16	$Fe(CN)_6^{4-} + Mo(CN)_8^{3-}$	2.00	$3.0\ 10^4$	$4\ 10^4$
17	$Fe(CN)_6^{4-} + MnO_4^-$	3.40	$1.7\ 10^5$	$6\ 10^4$

Una din probele în favoarea acestui mecanism este că dacă adăugăm amestecului de reacție $^{36}Cl^-$, el nu se regăsește în $CrCl^{2+}_{aq}$: atomul de Cl din $CrCl^{2+}_{aq}$ provine cu adevărat din produsul de plecare.

VIII.2. Transferul electronului în biochimie

În capitolele anterioare s-au studiat reacțiile redox între molecule mici care conțin ioni metalici. Reacțiile redox între două metaloproteine aparțin aceleiași clase de reacții. Totuși sunt de notat câteva diferențe. Transferurile de electroni în materialele biologice, au loc între proteinele imobilizate într-o membrană sau între o proteină solubilă (sau o moleculă

mică) activă din punct de vedere redox, cum ar fi apa oxigenată) şi o proteină imobilizată. În primul caz, transferul are loc cu o geometrie fixă; în al doilea caz, proteina sau molecula mică trebuie să se fixeze într-un centru precis (centru activ) şi această fază de ajustare poate fi etapă determinantă de viteză de reacţie. Între altele transferurile biologice de electroni au loc deseori pe distanţe lungi, care pot atinge 25 Å. Pe astfel de distanţe interacţiile electronice (termenul V_{12}) pot fi slabe şi transferurile diabatice. Aceasta impune să se ţină cont mai mult de efectele electronice: probabilitatea transferului la punctul de intersecţie a curbelor entalpiei libere nu este egală cu 1 şi depinde mult de V_{12}.

Fiind date aceste explicaţii, prezentăm câteva rezultate deosebite obţinute în ultimii ani.

VIII.2.1. Studiu experimental al interacţiei cyt c/ cyt b_5 . Efectul de ergonicitate al reacţiei asupra vitezei de reacţie

Următorul studiu a fost condus de profesorul G. McLendon şi de grupul său de cercetare de la Universitatea Rochester din statul NY (SUA).

Citocromii sunt molecule hemice specializate în transferul de electroni.

Figura VIII.5. Vedere stereoscopică a complexului cyt c/ cyt b_5.

Structurile citocromului c şi ale citocromului b_5 sunt cunoscute (a se vedea figura VIII.5). Aceşti doi citocromi au sarcini opuse şi pot să

formeze un compus de coordinație. O optimizare a atracțiilor electrostatice a fost făcută cu ajutorul unui calculator și a permis propunerea pentru structura acestui complex a structurii indicate în figura VIII.5. Vedem în această figură că structura optimă permite apropierea celor două hemuri care sunt centri activi ai produsului redox. Distanța între cele două centre ale hemurilor este de aproximativ 16 Å.

Vitezele de transfer electronic între cyt b_5 și diversele modificații ale cyt c pot fi măsurate prin experiențele următoare:

1) Fe(III)cyt c/Fe(III)cyt b_5 + e^-_{aq} → Fe(III)cyt c/Fe(II)cyt b_5
→ Fe(II)cyt c/Fe(III)cyt b_5
(k_{et}=1.6 ± 0.7*10^4 s^{-1})

2)H_2porph(cyt c)/Fe(III)cyt b_5+ e^-_{aq}→H_2porph^-(cyt c)/Fe(III)cyt b_5
→ H_2porph(cyt c)/Fe(II)cyt b_5
(k_{et}=8 ± 1*10^3 s^{-1})

3) ^{3}Znporph*(cyt c)/Fe(III)cyt b_5→Znporph$^+$(cyt c)/Fe(II)cyt b_5
(k_{et}=5 ± 1*10^5 s^{-1})

4) $^3H_2porph^*$(cyt c)/Fe(III)cyt b_5→H_2porph^+(cyt c)/Fe(II)cyt b_5
(k_{et}=5 ± 0.5*10^4 s^{-1})

Autorii au aranjat într-o serie constantele de viteză pentru o geometrie dată, dar având ΔG^0 diferite ce s-au putut calcula plecând de la potențialele redox standard, la pH = 7:

Fe(III)cyt c/ Fe(II)cyt c	E^0 = + 0.2 V
Fe(III) cyt b_5/ Fe(II) cyt b_5	E^0 = 0.0 V
H_2porph^+(cyt c)/$^3H_2porph^*$(cyt c)	E^0 = - 0.35 V
Znporph$^+$(cyt c)/^{3}Znporph*(cyt c)	E^0 = - 0.75 V
H_2porph(cyt c)/H_2porph^-(cyt c)	E^0 = - 1.10 V

În figura VIII.6 logaritmul constantelor de viteză este reprezentat în funcție de ΔG^0. Se vede că teoria lui Marcus este verificată: când mărimea entalpiei libere de reacție se mărește, crește și constanta de viteză ce trece printr-un maxim și apoi descrește.

Se vede că maximul este atins pentru o entalpie liberă de reacție ΔG^0 = - 0.8 eV ce implică o λ = 1.8 eV. Curba reprezentării grafice corespunde ecuației

$$k = A \exp\left[-\frac{(\lambda + \Delta G^0)^2}{4\lambda k_B T}\right]$$

determinată din punctele experimentale.

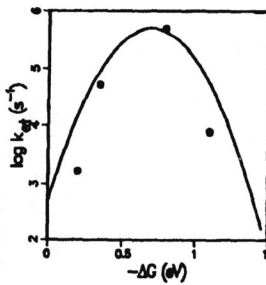


Figura VIII.6. Logaritmul constantei de viteză a transferului electronic în funcție de ΔG^0, pentru o serie de reacții între cyt b_5 și cyt c.

De notat că pentru o entalpie liberă optimă, constanta de viteză este $k = 5.10^5\ s^{-1}$, atunci cînd centrii a două hemuri sunt separate de 1,6 Å, această viteză pare remarcabilă.

Acest domeniu de cercetare este astăzi în plină dezvoltare.

În continuare ne vom ocupa de structura și proprietățile electronice ale principalelor proteine cu transfer de electroni.

VIII.2.2. Citocromii

Citocromii formează o clasă deosebit de importantă a proteinelor hemice. Majoritatea dintre ei au singura funcție de transfer de electron, dar în capitolele următoare vom prezenta citocromii ce au funcții mai mult "enzimatice": citocromii a și a_3 din citocrom c-oxidază (capitolul V) și citocromul P_{450} (capitolul VI).

Vom prezenta într-un mod detaliat citocromul c. Această moleculă se găsește în membrana mitocondrială. Masa sa moleculară este 12500; structura sa este cunoscută cu precizie datorită unei investigări radiocristalografice (figura VIII.7). Hemul, contrar hemoglobinei sau

mioglobinei este legat într-un mod covalent de lanțul peptidic. O altă diferență foarte importantă în raport cu hemoglobina este că, atomul de fer este hexacoordinat având pozițiile 5 și 6 ocupate de grupele imidazolice ale histidinei și grupele tiolice ale unei metionine. Este deci clar că dioxigenul nu se fixează pe hem.

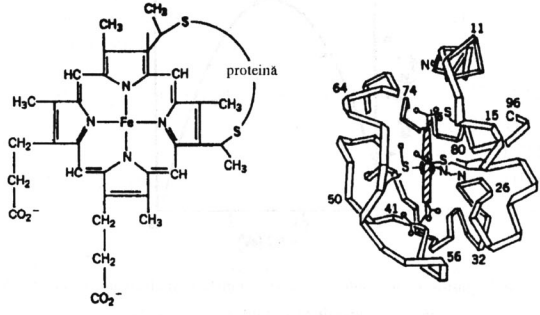


Figura VIII.7. Structura citocromului c.

Citocromul c îndeplinește funcția de transfer de electroni prin schimbarea reversibilă a stării de oxidare între Fe(II) și Fe(III). Aceasta este o altă diferență față de hemoglobină, deoarece s-a văzut că fierul rămâne tot timpul în starea (II), protejată în methemioglobină, unde există un ion Fe(III), dar este vorba de o formă nefuncțională.

VIII.3. Metaloenzimele, catalizatori ai reacțiilor redox

Energia chimică necesară pentru îndeplinirea multor funcții ale vieții se degajă în timpul reacțiilor redox din organisme.

Oxidantul principal în acest caz este oxigenul molecular, iar produșii de reducere sunt apa și apa oxigenată.

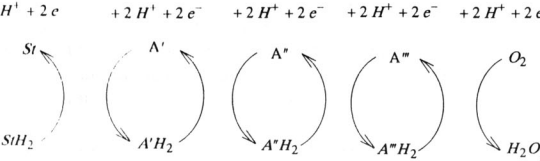
Cea mai mare parte a reacțiilor redox din organism poate fi reprezentată sumar cu ajutorul următoarelor reacții simplificate:

$$2\,StH_2 + O_2 \rightarrow 2\,St + 2\,H_2O \qquad \text{(VIII.1)}$$

$$StH_2 + O_2 \rightarrow St + H_2O_2 \qquad \text{(VIII.2)}$$

unde St este forma oxidată a substratului
StH_2 este forma redusă a substratului

Cele două reacții prezentate decurg în mod normal foarte încet, conform unui mecanism cu mai multe etape, cu participarea metaloenzimei în etapele intermediare. Aceste etape sunt indicate cu ajutorul unor cicluri, de exemplu :



În partea de sus a ciclului se notează de obicei forma oxidată ; în cea de jos cea redusă . Sensul săgeții , dacă este îndreptat în sus semnifică reacția de oxidare iar dacă este îndreptat în jos cea de reducere . Ciclurile din acest lanț se simbolizează consecvent cu creșterea potențialului redox ; din punct de vedere al condițiilor termodinamice se poate combina orice succesiune a ciclurilor pentru care potențialele redox cresc (sau descresc).

Acest lanț poate fi scris ca o sumă a unor procese redox simple de tipul :

$$StH_2 = St + 2H^+ + 2e^- \qquad \text{(VIII.3a)}$$

$$A' + 2H^+ + 2e^- = A'H_2 \qquad \text{(VIII.3b)}$$

$$A''H_2 = A'' + 2H^+ + 2e^- \qquad \text{(VIII.3c)}$$

.....

$$A^nH_2 = A^n + 2H^+ + 2e^- \qquad \text{(VIII.3d)}$$

$$O_2 + 2H^+ + 2e^- = H_2O_2 \qquad \text{(VIII.3e)}$$

Nu este exclusă și posibilitatea apariției în lanțul de reacții a unor etape redox, care să implice schimbul unui singur electron.

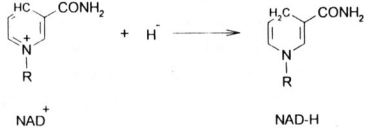
La începutul lanțului redox se află un cuplu de substanțe cu potențial redox destul de mic, iar la sfârșitul lanțului potențialul redox al cuplului este cel mai ridicat. Astfel, pentru cuplul O_2/H_2O_2 potențialul redox este de +0,30 V iar pentru cuplul RCHO/RCOOH este de +0,20 V. Intermediarii între aceste două cupluri trebuie să se caracterizeze prin niște

potențiale intermediare. La începutul secvențelor indicate se pot găsi zaharurile, aldehidele, fenolii, unii acizi, H_2S, hidrosulfit, etc. La sfârșitul secvenței pot funcționa în afara cuplului redox cu oxigen și azotatul (azotitul, azotul), amoniacul și alte substanțe.

Secvența prezentată, care conține mai multe etape, poate fi considerată și ca o secvență cu transfer de electroni sau de protoni (sau chiar al ionilor hidrură H^-). De la StH_2 la H_2O_2 printr-un șir de substanțe intermediare $A', A'', A''', \ldots A^n$.

Accelerarea acestor procese (transportul electronilor, ionilor sau atomilor) se efectuează prin participarea numeroaselor enzime, cea mai mare parte fiind din grupa metaloproteinelor. În calitate de coenzime, în procesele redox funcționează nu numai ionii metalici sau complecșii lor, ci și unele substanțe organice.

Un rol deosebit în reacțiile care decurg cu schimb de electroni îl joacă coenzimele cum ar fi NAD și FAD. Aceste substanțe pot foarte ușor lega ionii hidrură H^- și se reduc până la NAD-H și FAD-H_2:



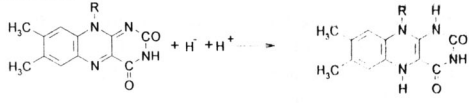
NAD^+ NAD-H

nicotinamida
adenindinucleotida

(VIII.4)

În NAD^+ restul nicotin-amidic se leagă cu R printr-un atom de N. Acest R reprezintă un adenin nucleotid cu două grupări fosfatice condensate . Dacă în structura adenin nucleotidei intră trei grupări fosfatice sistemul se notează NADP$^+$-NAD-PH. Potențialul redox al acestui cuplu este foarte mic, și anume -0,32 V.

Printr-un potențial mai mare se caracterizează cuplul redox flavinnucleotid:

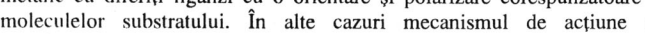


FAD
flavinadenindinucleotid

FAD - H_2

(VIII.5)

Cele mai importante modificări în timpul reducerii FAD au loc într-un proces care implică patru atomi:



Mecanismul de acţiune al centrilor activi în metaloproteine nu este complet elucidat. În unele cazuri el se reduce la formarea complexului metalic cu diferiţi liganzi cu o orientare şi polarizare corespunzătoare a moleculelor substratului. În alte cazuri mecanismul de acţiune al metaloenzimelor se manifestă prin oxidarea şi reducerea succesivă a ionului metalic.

Primul mecanism are loc în timpul acţiunii enzimelor redox de tip dehidrogenază care conţin zinc şi NAD . Dehidrogenazele accelerează brusc procesul de eliminare a anionului H^- de la alcooli, oxiacizi şi alţi reducători. În acest caz se formează produşi de oxidare.

În tabelul VIII.3 sunt prezentate unele dehidrogenaze care conţin zinc, se indică conţinutul lor în metal şi funcţiile lor. Atomii de zinc care intră în metaloenzime după cum se vede joacă un rol diferit în mecanismul de acţiune. Ei prezintă o comportare diferită şi în timpul schimbului ionic cu soluţia de zinc marcat (radioactiv) şi la acţiunea inhibitorilor.

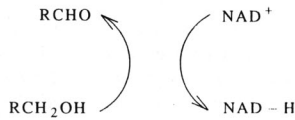
Putem spune că o jumătate din cantitatea totală a atomilor de zinc nu va lua parte în procesul catalitic, dar în acest caz se păstrează structura cuaternară şi terţiară a proteinei.

Tabelul VIII.3. Unele caracteristici ale unor dehidrogenaze care conţin Zn

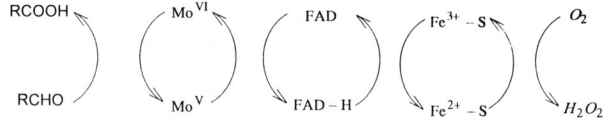
Enzima	Masa molecula ră	Cofactor	Reacţia
Alcooldehidrogenază	84.000	2 - 4 Zn 2 - 4 NAD	$RCH_2OH + NAD^+ = RCHO + NADH + H^+$
Malatdehidrogenază	40.000	1 - 2 Zn	malat + NAD^+ = oxaloacetat + NADH + H^+
Glutamatdehidrogenază	106.000	2 - 4 Zn n NAD - P	glutamat + NAD - P^+ = α-cetoglutarat + NH_3 + NAD-PH^+

Ceilalţi atomi de zinc se coordinează cu aminoacizii din proteină, restul adenin al NAD şi gruparea hidroxil alcoolică. Pe de altă parte, de molecula alcoolului se poate lega restul nicotinamidic care elimină ionul de hidrură din alcool.

În acest caz are loc un proces simplu de biocataliză, adică accelerarea reacției de oxidare-reducere într-o singură etapă de o enzimă care conține zinc.



O secvență de reacție redox cu mult mai complexă are loc în cazul oxidării aldehidelor sau hipoxantinei :



Aldehidoxidaza

În acest caz (schema simplificată) în metaloenzimă se realizează cel puțin trei reacții redox. În tabelul VIII.4 sunt prezentate unele caracteristici ale metaloflavoenzimelor în structura cărora intră câțiva atomi ai diferitelor biometale.

Tabelul VIII.4. Unele caracteristici ale metaloflavoenzimelor.

Metaloenzima	Masa moleculară	Cofactor	Reacția
Xantinoxidază	300.000	8 Fe , 2 Mo , 2 FAD	Xantină + O_2 = urat + H_2O_2
Aldehidoxidază	300.000	8 Fe , 2 Mo , 2 FAD	Aldehidă + O_2 = acid + H_2O_2
Nitratreductază	-	n Mo , n FAD	NO_3^- + NAD(P)H = NO_2^- + NAD(P)$^+$ + H_2O

În organismele vii sunt conținute un număr mare de metaloproteine care conțin fer. Unele dintre ele au fost discutate în capitolul 6. În tabelul VIII.5 sunt prezentate caracteristicile și unele proprietăți ale metaloenzimelor ce conțin fer. Pentru comparație sunt prezentate

potenţialele redox ale compuşilor mai simpli ai ferului.Enzimele care conţin fer, după structura lor se împart evident în două grupe:

— proteine heminice, care conţin inelul porfirinic în care sunt incluşi atomii de fer

— proteine neheminice.

Proteinele heminice care îndeplinesc funcţia de transportori de oxigen au fost discutate în capitolul VI. Aici se discută pe scurt proprietăţile proteinelor care conţin fer şi care au funcţii de enzime. Din proteinele de acest tip fac parte în primul rând diferiţi citocromi. Se cunosc mai mult de 50 dar îndeaproape sunt studiaţi numai câţiva, în special citocromul c. Clasificarea citocromilor se bazează pe diferenţa între structura grupării porfirinice şi deci pe diferenţele în spectrele de absorbţie.

Tabelul VIII.5. Unele caracteristici ale metaloenzimelor care conţin fer .

Metaloenzima sau sistemul redox	Masa moleculară	Conţinutul anorganic	E	Funcţia
$Fe(phen)_3^{3+} + e^- = Fe(phen)_3^{2+}$	-	-	1,10	-
$Fe^{3+} + 1e^- = Fe^{2+}$	-	-	0,77	-
	9500		0,35	-
Citocrom C	12000	1 Fe - ghem	0,22	Transport de electroni
$[Fe(CN)_6]^{3-} + 1e^- = [Fe(CN)_6]^{4-}$	-	-	0,22	-
	-	4 Fe , Hem	0,17	-
	13000		0,15	-
Citocrom b	-	-	0,05	-
	-	1 Fe , Hem	0,046	-
$Fe(C_2O_4)^{3-} + 1e^- = Fe(C_2O_4)^{4-}$	-	-	0,020	-
	6000		-0,170	-
	-		-0,251	-
$Fe^{III}(oxin)_3 + 1e^- = Fe^{II}(oxin)_3$	-		-0,420	-
	6000		-0,490	Transportor reversibil al electronilor

În citocromii b şi c în poziţiile 5 şi 6 sunt grupări care se coordinează printr-un câmp înalt al liganzilor şi deci ei fac parte din grupa compuşilor coordinativi cu spin scăzut (mic). În citocromul A poziţiile 5 şi 6 sunt ocupate de molecule de apă şi imidazol şi deci această metaloenzimă poate reţine oxigenul (cu eliminarea moleculei de apă).

Citocromii iau parte la procesele de fosforilare oxidativă. Macromolecula de citocrom c are o formă de sferoid (30*34*34 Å) şi conţine 104 resturi de aminoacizi . Inelul porfirinic cu fer este înconjurat de inelele hidrofobe ale resturilor de aminoacizi . Există două canale care duc de la suprafaţă înspre regiunea hidrofobă şi ferul hematic. Transportul electronilor poate fi efectuat şi prin sistemul π- conjugat al proteinei.

Un rol important în procesele vieţii îl joacă enzimele care conţin fer, peroxidaza şi catalaza. Peroxidaza catalizează reacţia de oxidare a diferitelor substraturi de către peroxidul de hidrogen (H_2O_2):

$$H_2O_2 + StH_2 \xrightarrow[\text{peroxidaza}]{} 2H_2O + St \qquad \text{(VIII.6)}$$

Catalaza accelerează procesul de descompunere al H_2O_2 cu degajarea oxigenului molecular:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \xrightarrow[\text{catalaza}]{} 2H_2O + O_2 \uparrow \qquad \text{(VIII.7)}$$

Reacţia (VIII.7) poate fi considerată ca un caz particular al reacţiei (VIII.6) în care reducător (StH_2) este tot molecula de peroxid de hidrogen şi deci în comportarea peroxidazei şi catalazei există asemănări.

Structura peroxidazei este asemănătoare cu cea a mioglobinei, dar mărimea potenţialului redox diferă suficient de mult.

Acţiunea catalitică a peroxidazei nu este specifică. Oxidarea cu peroxid de hidrogen a multor substraturi biologice este catalizată de unii ioni metalici, anioni de acizi şi numeroşi compuşi coordinativi relativ simpli.

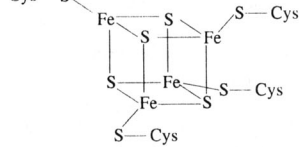
Catalaza, al cărei rol fiziologic nu este determinat complet diferă structural destul de mult faţă de alte hemoproteine.Masa ei moleculară este de 240000, în structura ei existând 4 resturi de „hem" care nu reacţionează unele cu altele, spre deosebire de hemoglobină.Gradul de oxidare al ferului în catalază este +3. Ferul în această metaloenzimă nu se reduce nici chiar

cu reducători puternici, formând un complex stabil cu anionul hidroperoxid (OOH^-).

Se cunoaşte un număr mare de proteine care conţin fer, în structura cărora nu intră grupări hematice. Unele din aceste proteine au fost discutate anterior; din ele fac parte în special transportorii oxigenului molecular. Unele proteine care conţin fer probabil că îndeplinesc funcţia de "acumulori" de fer şi de transport al ferului în organism (atomii de fer sunt necesari pentru înglobarea lor în structura multor proteine). Din proteinele de acest tip fac parte *feritina* şi *transferitina*. Feritina conţine fer şi grupări fosfatice având o masă moleculară de 460000, macromolecular conţinând 24 de subunităţi. *Transferitina* este caracterizată de o masă moleculară mult mai mica, de 77000, atomul de fer fiind legat cu trei resturi de tirozină şi două grupări imidazol.

Un interes special prezintă proteinele care conţin sulf , în structura cărora intră ferul, sulful sulfidic şi grupările cisteinice. Aceste metaloproteine au o masă moleculară relativ mică şi un potenţial redox foarte scăzut (până la - 0,43 V) şi de aceea aceste metaloenzime iau parte la multe procese biologice foarte importante, în special în procesul de fixare al azotului molecular, procesul de fotosinteză, fosforilarea oxidativă în mitocondrii, etc .

Una dintre cele mai importante proteine din acest grup, *feredoxina*, există în câteva varietăţi (specii). Cea mai studiată este feredoxina cu masa moleculară de circa 6.000 şi potenţialul redox circa -0,42 V. Macromolecula feredoxinei conţine 7 - 8 atomi de fer, 7 - 8 atomi de sulf şi 8 resturi de cisteină. Se presupune că se formează un "cluster" multiatomic de tip :

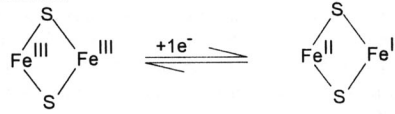


Distanţa între atomii de fer este mică aşa că este posibilă o interacţiune directă între atomii în cauză , analoagă cu interacţiunea din alte sisteme „cluster".

Analizele prin difracţie cu raze X ale acestei metaloproteine indică că atomii de fer nu sunt situaţi pe o dreaptă. În feredoxina redusă există probabil un număr identic de atomi de fer bi- şi trivalenţi. În prezent se

mai lucrează la determinarea gradului de oxidare al ferului (+2 sau +3) şi al sulfului (S^{-2} , S_2^{-2}) din acest compus.

Spectrele RPE ale feredoxinei au arătat că în forma redusă factorul este g = 1,89 - 2, iar în forma oxidată se formează compuşi care nu dau semnale RPE. O explicaţie foarte probabilă a acestui fapt constă în existenţa echilibrului:



Diamagnetismul apare ca rezultat al interacţiunii directe a doi atomi de fer (II).

Substanţe asemănătoare ca structură cu feredoxina au fost izolate din unele bacterii, potenţialul redox fiind mult mai mare (+ 0,35 V). Structura ei nu este complet determinată, iar în laborator ea figurează sub o denumire de „proteină care conţine fer" cu un potenţial redox înalt .

VIII.3.1 Proteine care conţin cupru

Proteinele care conţin Cu fac parte din metaloproteinele cele mai puţin studiate. A fost determinat faptul că ionii de cupru sunt strâns legaţi cu *apoproteina* şi eliminarea lor este de obicei un proces ireversibil. În multe cazuri, nu este determinată şi poziţia legăturii ionului de cupru cu proteina. Masele moleculare ale proteinelor care conţin cupru variază în limite largi de la 10^4 până la $n*10^6$ (tabelul VIII.6) . Cel mai bine este studiată hemocianina, discutată în capitolul VI.

Proteinele care conţin 1 atom de cupru/1 mol de proteină pot fi de diferite tipuri:

— albastre, cu un spectru de absorbţie caracteristic, ce conţin Cu^{+2}, au trei benzi intense cu maximele la λ = 450 , 600 şi 750 nm şi care se caracterizează prin următorii parametrii ai spectrului RPE: g_1 = 2,1 şi g_2 = 2,2 - 2,3; această grupă de proteine ia parte activă în procesul de transfer de electroni.

— roz , care conţin tot Cu (II) şi sunt caracterizate de o absorbţie destul de intensă ($\varepsilon \cong 2500$) ;

— metaloproteine care conţin Cu (I) şi care reacţionează uşor numai cu O_2 şi care transmit acestei molecule electroni; probabil în aceste cazuri se formează complecşi tripli de tip substrat - Cu(I)-O_2 în care are loc

transferul de electroni de la substrat la oxigen prin intermediul atomilor de Cu.

Tabelul VIII.6 . Caracteristicile unor proteine care conţin cupru

Metaloenzima sau sistemul redox	Masa moleculară	Conţinutul anorganic	E	Funcţia
Tirozinaza	120.000	4 Cu^{I}	-	
Lacaza	120.000	4 Cu^{II} , Cu^{I}	0,415	
Oxidaza acidului ascorbic	146.000	6 Cu^{II}	-	
Ceruloplasmină	151.000	8 Cu^{II}	0,37	
Aminooxidaza	100.000 - 300.000	n Cu^{II}	-	
Citocromoxidaza	10^5 - 10^6	1 Cu - ghem	-	
Azurina *	16.400	Cu^{II}	-	
Plastocianina	21.000	2 Cu	-	
$Cu(NH_3)_2^{+2}$ - $Cu(NH_3)_2^{+}$	-	-	0,340	
$Cu(imidaz)_2^{+2}$ - $Cu(imidaz)_2^{+}$	-	-	0,3454	
$Cu^{II}(gly)_2$ - $Cu^{I}(gly)_2$	-	-	0,160	

* Este foarte stabilă la factori externi (pH , temperatură)

Multe metaloproteine care conţin cupru, conţin câţiva atomi de cupru într-o macromoleculă. Atomii de cupru se situează în diferite poziţii, au diferite înconjurări şi geometrii diferite. Destul de des se întâlneşte gruparea diamagnetică care conţine doi atomi de cupru care sunt destul de apropiaţi unul de altul (Cu ... Cu) .

În citocromul a_3, cuprul intră în gruparea hematică, jucând probabil un rol de transportor de electroni deoarece poate foarte uşor să-şi modifice starea de oxidare:

$$Cu^{2+} + e^{-} \rightarrow Cu^{+}$$

Unele metaloproteine care conţin cupru sunt implicate probabil în procesele de producere prin biosinteză a pigmenţilor pielii animalelor.

VIII.3.2. Vitamina B_{12}

Sistemele biologice care conţin cobalt, cu excepţia coenzimei vitaminei B_{12} sunt studiate foarte puţin. Coenzima B_{12} prezintă un mare interes din punct de vedere chimic şi biologic. Structura ei este studiată destul de bine cu ajutorul diferitelor metode, inclusiv analiza prin difracţie de raze X şi este prezentată în figura I.7. În structura acestei coenzime intră corina (analog al porfirinei) în care atomul de Co este înconjurat de 4 atomi de N situaţi în planul xy. Poziţiile 5 şi 6 (pe axa z) pot fi înlocuite de alţi liganzi. De obicei ele sunt ocupate de grupările imidazol şi cianură, când se numeşte ciancobalamină. Dacă gruparea NC^- este înlocuită de alt ligand compusul se numeşte radical-cobalamina (hidroxi-, 5' deoziadenozil-, metil-cobalamină) iar dacă este înlocuită de gruparea imidazol, compusul se numeşte cobinamida.

Foarte importanţi pentru chimia bioanorganică sunt compuşii cu legătură chimică de tip σ Co - ligand. Coenzima B_{12} în organism are un şir de funcţii: participă la procesul de transfer al grupării CH_3 (metilare), la restructurarea scheletului mai multor molecule şi în reacţiile de reducere a substanţelor organice.

Pentru coenzima B_{12} şi analogii ei este caracteristică o modificare relativ uşoară a numărului de coordinare, de la 6 la 5 şi un echilibru între aceste forme.

În compuşii cu Co (III) se evidenţiază destul de puternic efectul în trans care constă în stabilirea echilibrului :

$$\underset{\text{(nr. de coord. 6)}}{\text{Complex Co(III) Cu}} \rightleftharpoons \underset{\text{(nr. de coord. 5)}}{\text{Complex Co(III) Cu}}$$

Spre deosebire de echilibrele obişnuite ale complecşilor de Co (III) acest echilibru se stabileşte foarte rapid.

Un al doilea specific al acestor compuşi este capacitatea lor de a se reduce uşor şi uneori incertitudinea gradului de oxidare , mai ales în cazurile interacţiunilor cu radicalul organic (R):

$$Co^{III}R^- \rightarrow Co^{II}R^{\cdot} \rightarrow Co^{I}R^+$$

Co^I şi Ni^{II} prezintă analogie electronică (structură electronică de 8 electroni d, d^8).

VIII.3.3. Activarea dinitrogenului

Până acum s-au discutat procesele redox cu participarea hidrogenului şi oxigenului, dar, pe lângă acestea, reacţiile redox pot decurge şi cu participarea compuşilor cu azot în care azotul are diferite grade de oxidare. Reacţiile de acest tip decurg de obicei cu participarea metaloenzimelor cu o structură destul de complexă. Cele mai importante astfel de procese sunt :

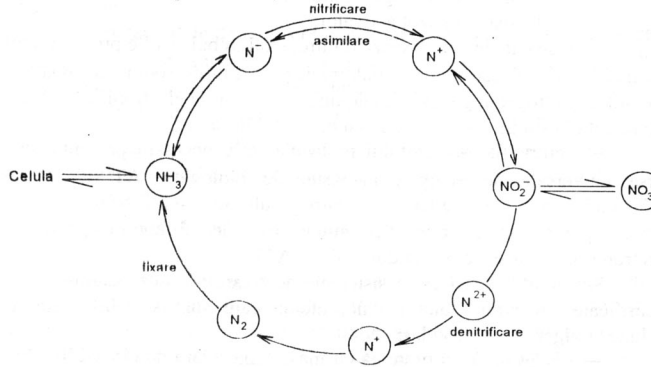
— fixarea azotului molecular cu transformarea lui în amoniac ($N_2 \rightarrow 2NH_3$). Acest proces se realizează cu participarea unor microorganisme de sine stătătoare sau în simbioză cu organismele complexe cu organizare înaltă ;

— nitrificarea, oxidarea amoniacului şi a aminelor până la azotiţi şi azotaţi;

— asimilarea, reţinerea azotaţilor de către organismele vii şi reducerea lor până la amine , în special până la aminoacizi ;

— denitrificarea, reducerea azotaţilor şi azotiţilor până la azotul molecular .

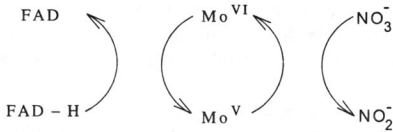
Schematic , aceste procese sunt prezentate în forma aşa - numitului ciclu al azotului (figura VIII.8).



$N^- = NH_2OH$, $N^+ = N_2O$ sau $N_2O_2H_2$ sau NOH, $N^{+2} = NO$, $N^{+3} = NO_2^-$, $N^{+5} = NO_3^-$

Figura VIII.8. Procesele de circulaţie ale azotului în biosisteme.

Procesul de oxidare al azotiților și de reducere a azotaților este studiat destul de amănunțit. Acest proces decurge cu participarea proteinelor ce conțin Mo; substraturile care se oxidează și se reduc sunt FAD-H_2 și FAD . Schematic , acest proces poate fi prezentat în felul următor :



O mare atenție se acordă în ultimul timp problemei fixării dinitrogenului în condiții ușoare la diferite nivele : la nivelul organismului, celulei, substratelor care nu conțin celule unice , la nivele macromoleculare și moleculare .

Recent au fost realizate fixarea extracelulară a azotului molecular de către substraturi biologice. În acest caz, a fost stabilite o serie de concluzii:

— fixarea N_2 are loc numai în condițiile absenței dioxigenului ;

— existența a două fracțiuni în structurile biologice care fixează azotul:

a) sistemul hidrogen donor și

b) sistemul azot activator;

— în sistemele care fixează dinitrogenul trebuie să fie prezenți unul sau mai mulți reducători foarte puternici: piruvatul de sodiu care poate fi înlocuit de hidrogenul gazos ; feredoxina, un donor de electroni, care poate fi înlocuită în studiile de modelare cu ditionitul de sodiu;

— pentru fixarea azotului molecular este necesară prezența unei surse universale de energie, în sistemele biologice, ATP-ul. Rolul ATP- ului în procesele de fixare a dinitrogenului în condiții blânde nu este încă complet elucidat, dar este determinat experimental faptul că pentru un electron transferat se consumă doi moli de ATP .

S-a putut preciza că în sistemele de fixare a dinitrogenului pot fi identificate cel puțin două metaloproteine care sunt sensibile față de acțiunea oxigenului molecular:

— *nitrogenaza* , o proteină cu masa moleculară de circa 270.000 - 300.000 care conține Mo, Fe, resturi de cisteină și sulf labil în raporturi masice de 1 : 20 : 20 : 15 ;

— metaloproteina cu masa moleculară de circa 40.000 care cuprinde doi atomi de Fe şi doi atomi de sulf labil pe mol.

Pentru fixarea azotului molecular este necesară prezenţa simultană a ambelor proteine. În acest caz ambele trebuie să aparţină la unul şi acelaşi sistem biologic (aerob sau anaerob).

Nitrogenaza este studiată foarte intens în ultimul timp. Astăzi se sintetizează modelele ei, se determină acţiunea diferiţilor inhibitori asupra activităţii ei etc. În timpul acestor investigări s-a determinat faptul că nitrogenaza nu este specifică faţă de substrat (N_2) putând reduce şi o serie de alte substanţe (N_2O , N_3^- , CN^- , C_2H_2 , CH_3-CN etc).

Informaţiile prezentate în acest capitol arată că metaloenzimele care catalizează procesele redox sunt foarte numeroase, complexe şi destul de puţin studiate.

Totuşi se pot enumera unele caracteristice mai importante ale acestei clase de metaloenzime:

— respectarea principiului lui Franck-Condon necesită asemănarea configuraţiilor formelor oxidate şi reduse. În consecinţă, centrul coordinativ în metaloenzimele de acest tip se caracterizează printr-o structură "intermediară" oarecum neobişnuită;

— în metaloenzimele care catalizează procesele redox se observă şi o stare "intermediară" a ionului metalic cu privire la gradul de oxidare şi la starea de spin;

— potenţialele de reducere în enzimele care caracterizează procesul redox, chiar şi pentru unul şi acelaşi cuplu redox depind foarte mult de înconjurare (aşa cum a fost dat exemplul pentru proteinele care conţin Fe);

— prezenţa proceselor care implică participarea mai multor electroni (ca: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$) necesită existenţa în metaloproteine a unui sistem de centri activi apropiaţi unul de altul.

VIII.4. Conversia H_2O/O_2. Fotosinteza şi respiraţia

Numeroase metaloproteine au un rol deosebit de important în procesele de fixare ale dioxigenului fiind implicate în procesele de transfer electronic care au loc în timpul respiraţiei şi fotosintezei. Vom prezenta în continuare metaloenzimele care în procesul de fotosinteză catalizează reacţia:

$$2\,H_2O \;=\; O_2 \;+\; 4\,H^+ \;+\; 4\,e^-$$

iar în procesul de respiraţie reacţia inversă. În secolul al XVIII - lea Priestley a demonstrat prin experienţa ilustrată în figura VIII.9, că plantele degajează dioxigenul.Experienţa sa este un simbol al relaţiei chimice între respiraţie şi fotosinteză.

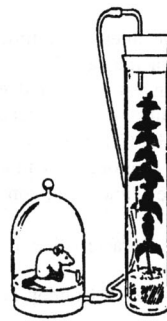


Figura VIII.9. Experienţa lui Priestley, care demonstrază degajarea dioxigenului de către plante.

Utilitatea acestor reacţii pentru celule este de a permite funcţionarea enzimelor de fosforilare a ADP - ului în ATP şi de a stoca astfel energia care le este necesară.

De remarcat că există organisme fotosintetice a căror funcţionare nu implică oxidarea apei.Vom spune câteva cuvinte, dar nu vom insista asupra plantelor şi cianobacteriilor care au dezvoltat un sistem polimetalic pentru oxidarea apei. Cianobacteriile sunt fără îndoială, organismele care au introdus dioxigenul pe pământ şi au permis astfel dezvoltarea vieţii aerobice.

Vom prezenta de asemenea cum au încercat chimiştii să realizeze fotosinteza artificială.

VIII.4.1. Fotosinteza. Aspecte introductive

Plantele încorporează dioxidul de carbon datorită fotosintezei. Simultan, ele degajă dioxigenul, conform unei reacţii binecunoscute:

$$6\,CO_2 + 6\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2$$

Reacţia fundamentală a fotosintezei este oxidarea apei în dioxigen. Cum s-a văzut anterior, aceste reacţii eliberează patru electroni şi patru protoni. Aceşti electroni sunt transferaţi unei părţi a sistemului fotosintetic, pentru reducerea $NADP^+$ în NADPH. Acest reducător este utilizat în transformarea dioxidului de carbon în glucoză, printr-un ciclu de reacţie, numit ciclul lui Calvin. Acest ciclu utilizează ATP - ul. Acesta se formează plecând de la ADP, de asemenea prin aparatul fotosintetic: aceştia sunt protoni formaţi în reacţia precedentă care permite formarea ATP - ului.

Cum poate fi oxidată apa prin aparatul fotosintetic ? Schema de principiu a fotosintezei în plante este prezentată în figura VIII.10.

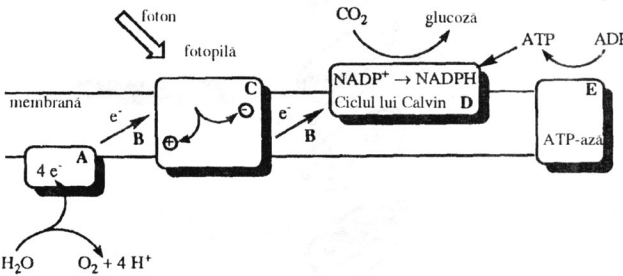


Figura VIII.10. Schema de principiu a fotosintezei în plante.

Unitatea de bază este fotopila C capabilă, la eliminarea unui foton, să creeze o sarcină pozitivă şi una negativă.Această unitate a fost denumită *centru de reacţie*. Sarcina pozitivă corespunde unui oxidant chimic iar sarcina negativă unui reducător chimic.

Electronii merg spre unitatea D unde CO_2 este redus prin intermediul NADPH şi ATP - ului.

Sarcinile pozitive sunt acumulate în unitatea A până la numărul de patru; apoi ele sunt neutralizate de cei patru electroni proveniţi din două molecule de apă.Protonii formaţi se acumulează într-o parte a membranei creând astfel un gradient de concentraţie al protonilor, folosit de ATP-aza (E) pentru fosforilarea ADP-ului în ATP.

Electronii trec din unitatea A în unitatea C şi apoi în D, cu ajutorul sistemelor transportoare de electroni (unitatea B).

Aparatul fotosintetic va fi prezentat în continuare mai detaliat.

VIII.4.2. Fotosinteza în plante şi bacterii

VIII.4.2.1. În plante

Aparatul fotosintetic al plantelor este situat în cloroplaste. Aceste organite conţin mici pungute (saci, buzunare) numite „*thylacoide*" în a căror membrane este situat aparatul fotosintetic. Aceste „*thylacoide*" sunt suprapuse pentru a forma „granule".

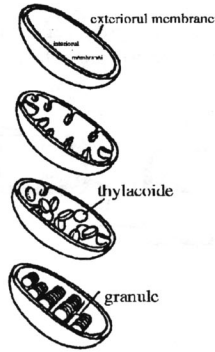


Figura VIII.11: Structura unui cloroplast.

Organizarea aparatului fotosintetic în membrana „*thylacoidă*" este foarte apropiată de schema de mai sus. Diferenţa importantă este că există două fotopile în serie în loc de una singură. Schema reală este prezentată în figura VIII.12.

Se constată prezenţa a două centre de reacţie, fotosistemul I (FS I) şi fotosistemul II (FS II). FS II utilizează fotoni cu λ de 700 nm. Aceşti fotoni sunt captaţi de antene formate de moleculele de clorofilă.

La ieşirea din FS II electronii sunt transportaţi cu ajutorul hidrochinonelor spre citocromul „f" şi de aici în FS I printr-o proteină solubilă cunoscută sub denumirea de plastocianină.

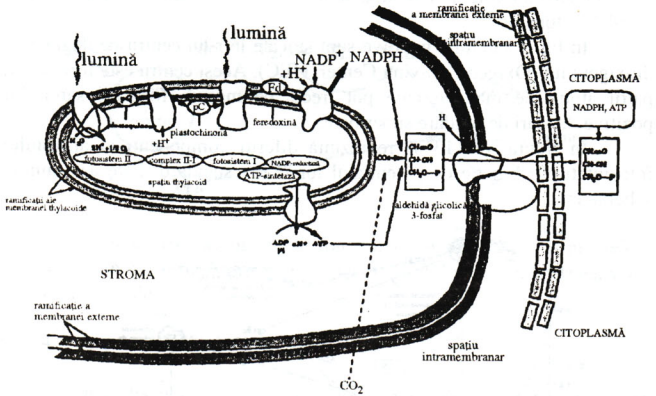
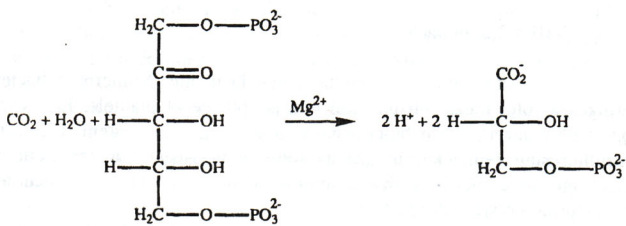


Figura VIII.12 : Organizarea aparatului fotosintetic al plantelor.

Acești electroni a căror energie crește prin FS I sunt apoi transmiși unei proteine solubile fier-sulf, feredoxină, care reduce la rândul său $NADP^+$ la NADPH.

In ceea ce privește inserția de CO_2, prima etapă este reacția cu D-ribuloză 1,5 bisfosfat pentru a da două molecule de D-3-fosfoglicerat, conform reacției :



Această reacție este catalizată de către ribulozo-bisfosfat-carboxilaza (RuBisCO) care pentru a funcționa are nevoie de ionul Mg^{2+}.

Această enzimă este foarte abundentă pe pământ (40.10^6 tone), fixând anual 10^{11} tone de CO_2 !

În FS II sarcinile pozitive sunt stocate într-un centru de degajare a dioxigenului (Oxigen Evolving Center, OEC). Acest centru este format din patru atomi de mangan care pot trece, pe măsura formării sarcinilor pozitive, la stări de oxidare superioare.

În figura VIII.13 se reprezintă diferiți componenți ai aparatului fotosintetic în funcție de potențialul lor redox standard. Este așa numita schemă în Z.

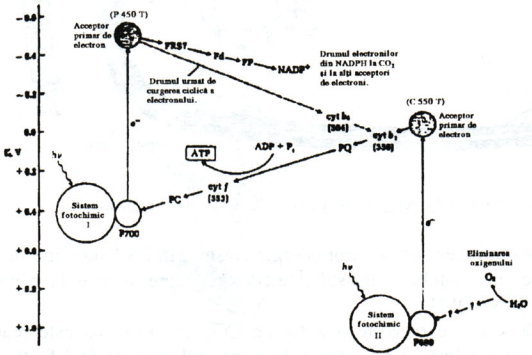


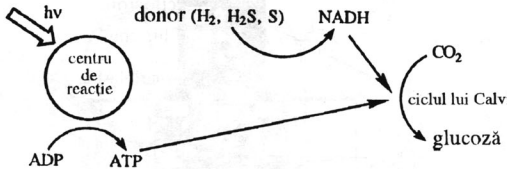
Figura VIII.13. Schema în Z a componenților aparatului fotosintetic al plantelor.

VIII.4.2.2. In bacterii

Fotosinteza nu este limitată numai la plante. Numeroase bacterii utilizează fotosinteza într-un mod mai simplu decât plantele. Este cazul bacteriilor purpurii. Ele funcționează cu un singur fotosistem. Electronii rezultați sunt reinjectați în același fotosistem. Acest transfer ciclic de electroni este cuplat la realizarea unui gradient de protoni și conduce deci la fosforilarea ADP-ului la ATP.

Aceste bacterii utilizează CO_2 ca sursă de carbon. Ca și în plante el este metabolizat prin ciclul lui Calvin. S-a văzut că ATP-ul este de origine fotosintetică. Reducătorul este NADH-ul furnizat printr-o reacție care consumă H_2, H_2S sau S.

Organizarea energetică a bacteriilor purpurii este următoarea:



Cianobacteriile au un aparat fotosintetic analog cu cel al plantelor. Există și alte bacterii fotosintetice, dar studiul lor ne îndepărtează de subiectul cărții de față.

VIII.4.3. Aspecte particulare ale fotosintezei

După discutarea caracteristicilor principale ale fotosintezei în plante, cianobacterii și bacteriile purpurii se vor prezenta unele aspecte particulare ale acesteia pe care chimiștii încearcă să le modeleze.

VIII.4.3.1. Centrul de reacție : o pilă fotochimică

S-a arătat că în mijlocul aparatului fotosintetic există centrul de reacție în care are loc evenimentul fotochimic primar, adică formarea unei perechi electron-gol.

În 1988, J.Deisenhofer, H.Michel și R.Huber au primit premiul Nobel în chimie pentru studiul cristalografic al centrului de reacție al bacteriei purpurii *Rhodopseudomonas viridis*. Stuctura este prezentată în figura VIII.14.

Circuitul urmat de electroni este indicat de săgeți. Perechea electron-gol este creată de perechea de bacterioclorofile BCMP-BCLP. În 2,8 ps electronul migrează pe bacteriofeofitină BFL, apoi în 200 ps pe chinona Q_A. Rolul bacterioclorofilei BCLA nu este încă elucidat. Electronul migrează apoi din Q_A către Q_B prin intermediul unui ion de fier. Când chinona Q_B a fost redusă de două ori $Q_B + 2\ e^- = Q_B^{2-}$, hidrochinona formată migrează către un centru vecin, citocromul b/c_1. Acest citocrom reduce un citocrom c_2 solubil, care conduce electronii spre centrul de reacție. Astfel bucla este închisă.

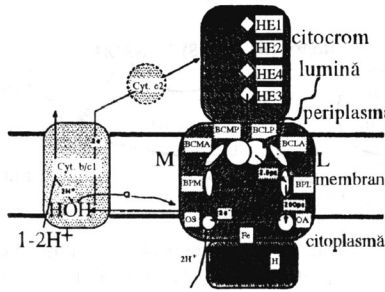


Figura VIII.14. Structura centrului de reacție al Rhodopseudomonas viridis.

Studiul cristalografic a permis precizarea dispunerii în spațiu a diferitelor grupe și a fost primit ca un eveniment științific important al anului 1988. Un rezultat surprinzător al acestor cercetări a fost simetria înaltă de organizare a diferiților componenți în jurul unei axe C_2.

Nu se cunoaște în detaliu centrul de reacție al procesului de fotosinteză din plante, dar diferite experiențe sugerează că ele au o structură asemănătoare.

VIII.4.3.2. Rolul ionilor de mangan în procesele de degajare a dioxigenului

S-a văzut anterior că în plante și cianobacterii electronii provin din procesul de oxidare a apei la dioxigen. Această reacție are loc la nivelul FS II a cărui structură propusă în prezent de către specialiști este prezentată în figura VIII.15.

Dioxigenul se formează la nivelul centrului de degajare al oxigenului(Oxygen Envolving Center, OEC). Structura acestui centru este încă necunoscută, dar multe echipe de cercetare din lume lucrează la rezolvarea acestei probleme.

Studiile lui P.Joliot au arătat în 1968 că cloroplastele adaptate la întuneric apoi luminate cu fascicule (flash), nu degajă oxigen de la primul fascicul. Trebuie așteptat al treisprezecelea flash pentru a observa formarea dioxigenului.

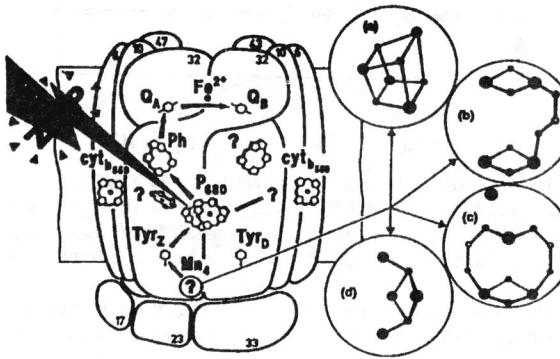


Figura VIII.15. Structura centrului FS II al plantelor.

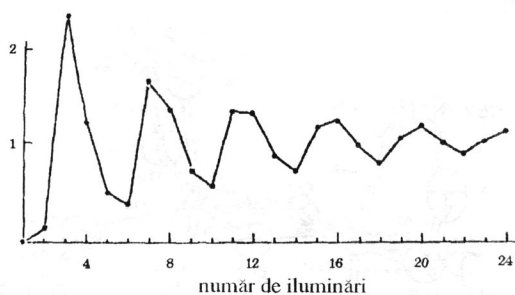
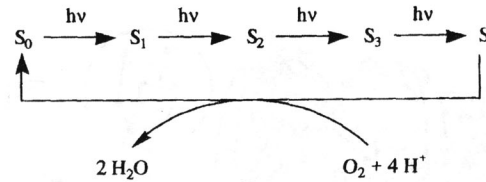


Figura VIII.16. Experiența lui P.Joliot asupra degajării oxigenului din FS II.

Această observație a fost explicată presupunând că OEC trece prin cinci stări electronice consecutive S_0 - S_4 din care doar ultima (S_4) este susceptibilă să elibereze dioxigenul.



La întuneric sistemul s-a stabilizat în starea S_1 şi au fost necesare trei fluxuri luminoase pentru obţinerea dioxigenului. Biologii sunt capabili prin metode specifice disciplinei să pregătească sistemul într-una din stările S_0 - S_3 şi deci pot studia din punct de vedere spectral aceste stări diferite.

Prin spectroscopie EXAFS s-a determinat că în mijloc, fiecare atom de mangan întâlneşte un alt atom de mangan la o distanţă de 2,7 Å. Această distanţă corespunde exact distanţei observate în complexul dinuclear artificial $[(bipy)_2MnO_2Mn(bipy)_2]^{3+}$, a cărei structură este prezentată în figura VIII.17. Pe baza acestor acestor date, se poate trage concluzia că există posibilitatea ca în situs să se găsească două unităţi $[MnO_2Mn]$.

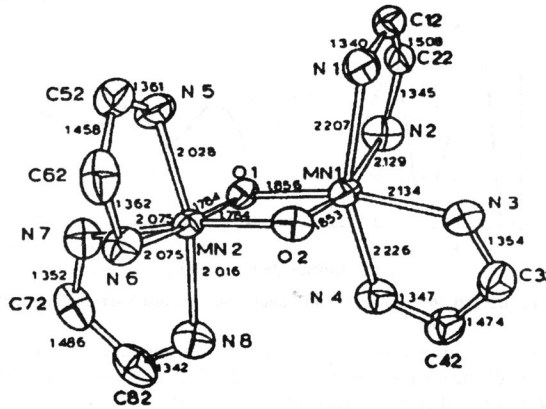


Figura VIII.17. Structura complexului $[(bipy)_2\ MnO_2Mn(bipy)_2]^{3+}$,prezentând unitatea MnO_2Mn, care se pare că există în situsurile naturale.

În plus se observă un maxim la 3,3 Å care corespunde la un număr mediu de atomi egal cu 0,5. Această distanţă este apropiată de aceea observată în compuşii coordinativi de tip hemeritrină, ca acela prezentat în figura VIII.18.

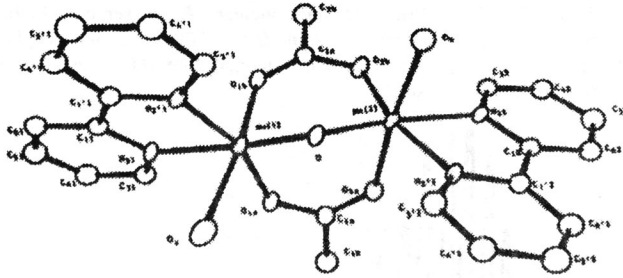


Figura VIII.18. Structura complexului $[(bipy)(H_2O)\ MnO(CH_3CO_2)_2Mn\ (H_2O)(bipy)]^{2+}$ prezentând gruparea $MnO(CH_3CO_2)_2Mn$ care se pare că există în situsurile naturale.

Modelul propus de grupul lui M.Klein este prezentat în figura VIII.19. unde se recunosc detaliile menţionate mai sus. Această structură se va modifica puţin în cursul ciclului enzimatic.

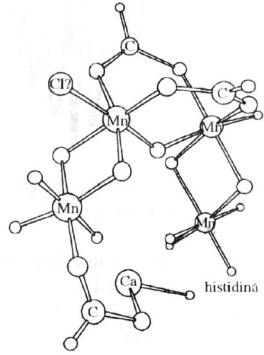


Figura VIII.19. Structura OEC propusă de M.Klein.

Mai multe informaţii asupra stucturii au fost furnizate de spectroscopia RPE. În 1981 Charles Dismukes şi Yona Siderer au detectat în starea S_2 un semnal multiliniar centrat în jur de g = 2 (figura VIII.20) care aduce proba definitivă a implicării manganului în această reacţie şi a faptului că centrul catalitic este multinuclear. Acest semnal provine dintr-un cluster de mangan cu spin S = 1/2, rezultatul cuplării antiferomagnetice a spinilor ionilor de mangan care formează clusterul (conform proteinelor fier-sulf).

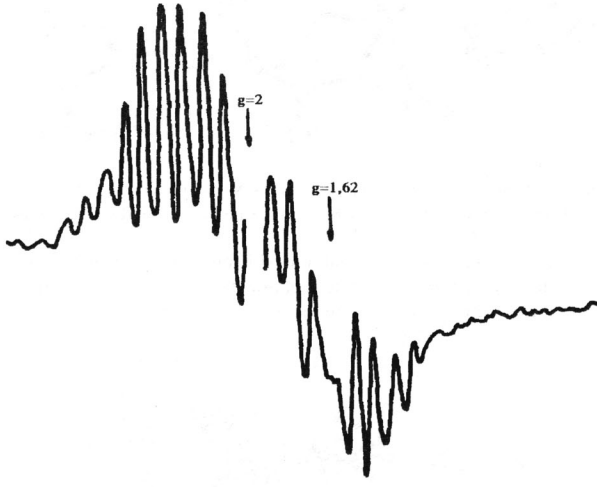


Figura VIII.20. Spectrul RPE al centrului de degajare al dioxigenului din plante, în starea S_2

În etapa următoare a mecanismului (starea S_3) semnalul dispare. În 1990 A.Bousac, J.L.Zimmermann şi J.Lavergne au făcut o observaţie foarte importantă. În starea S_3 situsul natural continuă de fapt să dea semnal, dar mult mai slab şi fără structură multiplă, ca semnalul precedent. Acest nou semnal s-a interpretat ca fiind produs de cuplarea sistemului polimanganic în starea precedentă şi un radical rezultat din oxidarea

grupării imidazol a histidinei. Acest rezultat sugerează că în etapa $S_2 \rightarrow S_3$... nu este oxidat ionul metalic ci histidina. Ansamblul polimetalic singur, nu este capabil să atingă o putere oxidantă suficient de mare pentru a oxida apa într-un proces concertat cu participarea a patru electroni.Deci se pote afirma că mecanismul nu este încă complet elucidat, dar în continuare se acumulează informații în acest domeniu.Una din ipotezele actuale este prezentată schematizat astfel:

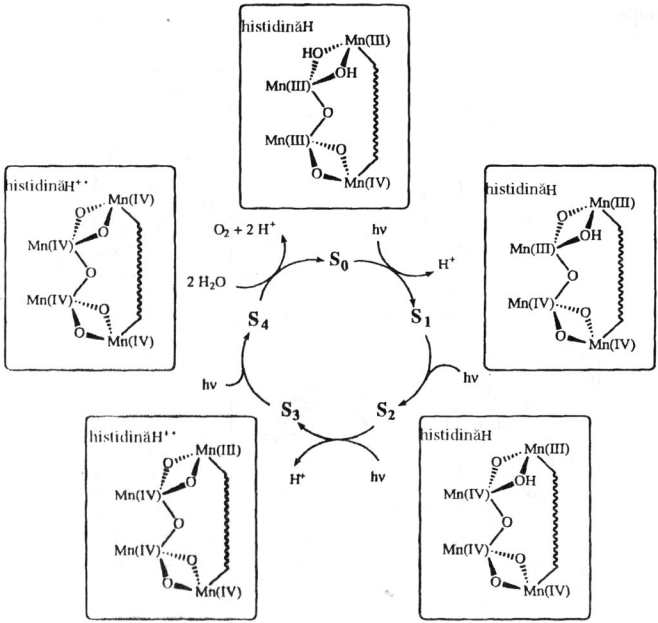


Figura VIII.21. Propunere de mecanism de acțiune pentru centrul de degajare al oxigenului.

Starea S_0 conține trei ioni Mn(III) și un ion Mn(IV).Nu se cunoaște faptul de ce această stare nu a putut fi determinată prin RPE. În starea S_1

se vor găsi doi ioni de Mn(III) şi doi ioni de Mn(IV). Această stare nu va da semnal în RPE, din cauza anulării reciproce a spinilor. Starea S_2 are un ion Mn(III) şi trei ioni Mn(IV). Spectrul său a fost înregistrat şi interpretat de Dismukes şi Siderer. În starea S_3, echivalentul oxidant suplimentar este stocat pe un nucleu de histidină. Starea S_4 conţine patru ioni Mn(IV). Această stare posedă o capacitate oxidantă suficient de mare pentru declanşarea reacţiei.

Reacţia de oxidare a apei se va face de asemenea, în mai multe etape.

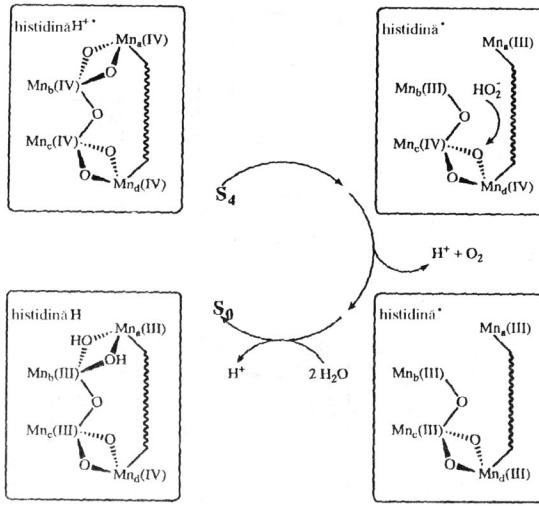


Figura VIII.22. Mecanismul reacţiei de oxidare a apei cu implicarea centrilor pe bază de mangan.

Prima etapă constă în formarea ionului HO_2^- ,declanşată prin protonarea unuia din atomii de oxigen legaţi în punte. Atomii de mangan a

şi b vor fi reduşi la Mn(II). Apoi dimerul cd va oxida HO_2^- la O_2 . Atomii de mangan c şi d sunt în continuare la starea (III). Punţile hidroxo se formează între atomii a şi b. În continuare un electron şi un proton sunt transferaţi pe histidină pentru a închide ciclul, deci pentru refacerea stării S_0.

VIII.4.4. Respiraţia

Din prezentarea anterioară, s-a văzut cum folosesc plantele şi bacteriile lumina pentru fosforilarea ADP-ului. Numeroase organisme sunt incapabile să folosească direct lumina. Ele realizează această fosforilare prin intermediul unei reacţii redox:

$$X_{red} + A_{ox} = X_{ox} + A_{red}$$

Atunci când acceptorul A_{ox} este O_2 ,acest fenomen se numeşte respiraţie.În etapa determinantă a respiraţiei, O_2 este redus la apă, după reacţia:

$$O_2 + 4e^- + 4H^+ = 2H_2O$$

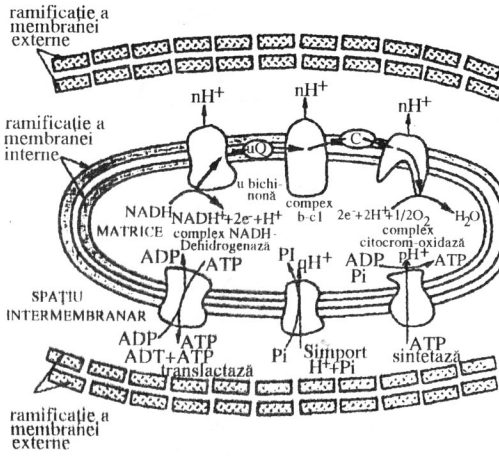
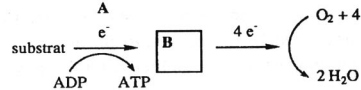


Figura VIII.23. Organizarea lanţului respirator.

Pentru respiraţie se poate propune următoarea schemă de principiu:



Se observă laţul de tranfer al electronilor (A), care conţine proteine fier-sulf şi citocromii.În celulele eucariotelor, aceste reacţii au loc în mitocondrii. Organizarea lanţului respirator este prezentată în figura VIII.23.

Unitatea B unde se produce reducerea dioxigenului (O_2), este un sistem complex numit citocrom c-oxidază. Electronii lui sunt aduşi pe citocromul c, ceea ce explică denumirea de enzimă terminală. Structura acestui sistem redox nu este cunoscută cu exactitate. O ipoteză actuală este reprezentată în figura VIII.24.

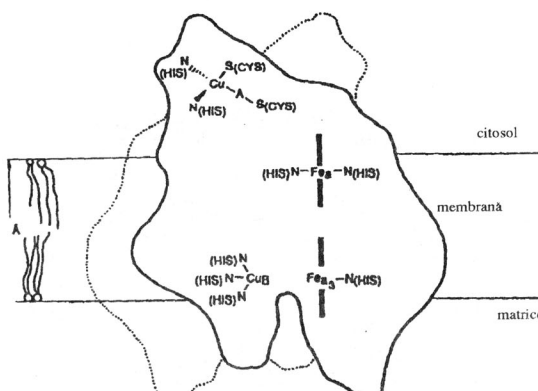


Figura VIII.24. Schema citocrom c- oxidazei.

Se ştie că enzima conţine patru atomi metalici: doi atomi de cupru şi doi atomi de fier. Cei doi atomi de fier aparţin la două hemuri numite cyt a şi cyt a_3 . Atomul de fier din cyt a ar fi legat de două histidine, în

poziție axială, iar cel din cyt a_3 nu va fi legat decât la un aminoacid (histidină), cealaltă poziție fiind liberă pentru coordinarea cu dioxigenul.

Atomul de cupru Cu_A va fi legat prin doi atomi de sulf din cisteină și două histidine (ca în plastocianină). Atomul de cupru Cu_B va fi legat de trei histidine (ca în hemicianină). Dioxigenul se va lega la fel de Cu_B .Atomii de fier pot fi în starea de oxidare II sau III iar atomii de cupru în stările I sau II.

Caracteristicile importante ale mecanismului sunt propuse în figura VIII.25.

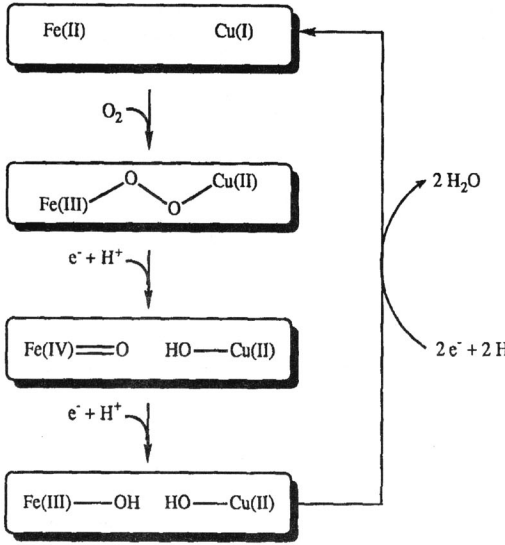


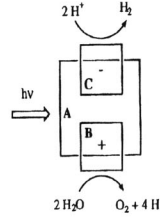
Figura VIII.25.Mecanismul schematic al reducerii dioxigenului prin citocrom c-oxidază.

VIII.5. Modelarea chimică a fotosintezei

Fotosinteza este un sistem fascinant pentru chimiști. Un sistem fotosintetic minimal comportă trei părți. Unitatea A trebuie să fie capabilă

să transforme energia luminoasă într-un echivalent oxidant şi un echivalent reducător: Cu alte cuvinte să realizeze separarea sarcinilor. Aceasta este deja foarte dificil de realizat experimental.

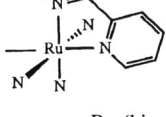
Unităţile B şi C vor trebui să permită utilizarea chimică a acestor echivalenţi, oxidanţi şi reducători, fapt iarăşi dificil. Într-adevăr chiar presupunând că echivalenţii redox creaţi după separarea sarcinilor sunt în stare să oxideze termodinamic apa, pe de o parte ($E^{0'} > 0.81$ V la pH = 7) şi să reducă H^+ ($E^{0'} < -0.42$ V la pH = 7) pe de altă parte, ei nu pot în general să o facă rapid. Bineînţeles, dacă se crează aceşti echivalenţi redox cu astfel de energii încât variaţia entalpiei libere ΔG^0 a reacţiilor să fie negativă, viteza ar putea fi suficientă, dar această soluţie nu este economică din punct de vedere energetic.



Dacă se urmăreşte lucrul cu minimum termodinamic sunt necesari catalizatori care accelerează aceste reacţii; este conceptul catalizei redox.

VIII.5.1. Separarea sarcinilor

Chimiştii au sintetizat mai multe sisteme capabile să îndeplinească această funcţie.Vom examina detaliat unul dintre ele. Complexul $[Ru(bipy)_3]^{2+}$, este un *star* în chimia anorganică :



Este fără îndoială complexul cel mai studiat. El are proprietăţi extraordinare. În particular, prin iluminare, el poate trece într-o stare excitată corespunzătoare unui transfer de sarcină internă de la metal către ligand (LMCT = Ligand Metal Charge Transfer):

$$Ru(bipy)_3^{2+} \rightarrow Ru(bipy)_3^{2+*} = Ru(III)(bipy^{\cdot-})(bipy)_2^{2+}$$

Se observă că, în stare excitată are loc apariţia unei sarcini pozitive pe Ru şi una negativă pe ligand; această stare excitată are o durată de viaţă suficientă pentru a fi utilizată chimic . Se poate deci considera acest sistem ca un dispozitiv de separare fotochimică a sarcinilor.

Starea oxidată se poate stabiliza printr-un oxidant:

$Ru(bipy)_3^{2+*} + ox \rightarrow Ru(bipy)_3^{3+} + red$

sau printr-un reducător:

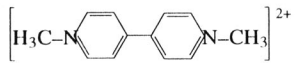
$Ru(bipy)_3^{2+*} + red \rightarrow Ru(bipy)_3^{+} + ox$

În primul caz se obţine un oxidant puternic $Ru(bipy)_3^{3+}$ ($E^{0'} = +1.3$ V) ; în al doilea caz rezultă un reducător puternic $Ru(bipy)_3^{+}$ ($E^{0'} = -1.3$ V).

Posibilităţile primei reacţii au fost mult studiate.

VIII.5.2. Degajarea hidrogenului molecular

Această reacţie a fost realizată utilizând stabilizarea printr-un oxidant, metil-viologenul, MV^{2+}:



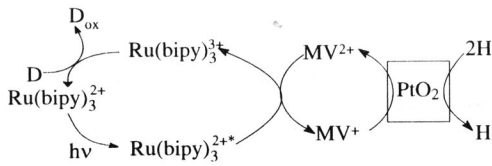
Potenţialul cuplului MV^{2+}/MV^{+}, $E^{0'} = -0.4$ V, este suficient pentru a reduce H^+ la H_2 . Este necesar un catalizator : oxidul de platină (PtO_2) care este deosebit de eficace. O reacţie care trebuie evitată este cea de recombinare :

$Ru(bipy)_3^{3+} + MV^{+} \rightarrow Ru(bipy)_3^{2+} + MV^{2+}$

care bineînţeles consumă MV^{+}.

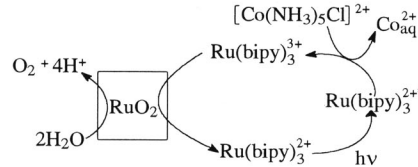
Reacţia $Ru(bipy)_3^{3+} \rightarrow Ru(bipy)_3^{2+}$ trebuie realizată pentru reformarea $Ru(bipy)_3^{2+}$. Aceasta se face cu ajutorul unui donor de sacrificiu D (de exemplu EDTA).

Sistemul care a funcţionat experimental poate fi rezumat prin schema următoare:



VIII.5.3. Degajarea dioxigenului

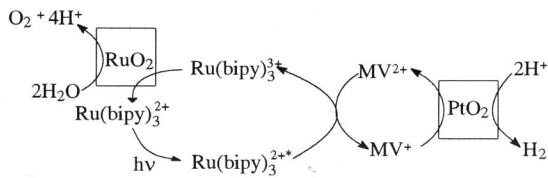
O soluție a acestei probleme a fost dată în anul 1979 de J.M.Lehn, J.P.Sauvage și R.Ziessel. O stabilizare la oxidare a Ru $(bipy)_3^{2+*}$ se realizează folosind complexul $[Co(NH_3)_5Cl]^{2+}$, care este sacrificat în experiență. Forma oxidată Ru $(bipy)_3^{3+}$ este apoi folosită pentru oxidarea apei, prin intermediul unui catalizator (în acest caz RuO_2). Schema de reacție este următoarea :



VIII.5.4. Descompunerea fotochimică a apei

Evident că experiențele precedente nu realizează propriu-zis fotoliza apei. În prima, este consumat un reducător de sacrificiu. În a doua avem un oxidant de sacrificiu.

Cuplarea celor două reacții precedente a fost încercată de grupul M.Gratzel, dar rezultatele nu au fost concludente. Schema de reacție ar putea fi:



Au fost încercate experiențe asemănătoare, înlocuind MV^{2+} cu Eu^{3+} și folosind argile drept suport al reacțiilor. Aceste experiențe au avut ceva mai mult succes dar totuși insuficient pentru a se considera eficace în descompunerea fotochimică a apei, care este o problemă rezolvată. Evident o astfel de realizare va fi importantă deoarece va permite utilizarea

energiei solare pentru a extrage hidrogenul din apă, care este o sursă potențială de energie.

VIII.6. Câteva metaloenzime care utilizează O_2 sau H_2O_2 ca oxidant

Din cele discutate în capitolele precedente s-a observat că dioxigenul este produs de plante, redus la apă în mitocondrii și fixat reversibil de unele proteine.

În acest capitol, vom prezenta câteva metaloenzime ce catalizează oxidarea substraturilor endo sau exogene, prin intermediul O_2 (oxigenaze, oxidaze) sau H_2O_2 (peroxidaze). Vom prezenta în continuare câteva noțiuni despre catalaze, a căror funcție principală este de a controla concentrația de H_2O_2.

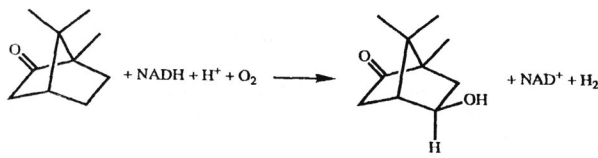
VIII.6.1. O monoxigenază a reticulului endoplasmatic: Citocromul P-450

Citocromul P-450 este o enzimă extrem de importantă în hidroxilarea legăturilor C-H, din diferiți compuși care apar normal în metabolism sau externi și care trebuie să fie eliminați din organism. Prin hidroxilare, acești compuși devin hidrosolubili. În afara acestor acțiuni benefice el este implicat în cancerogeneză, ca agent responsabil de activarea cancerigenă a unor compuși. Această enzimă este localizată în special în celulele hepatice.

Barbituricele pot fi de exemplu, detoxifiate prin intermediul acestei enzime. Această acțiune se poate demonstra injectând un sedativ barbituric unui șobolan. Unul din efectele cele mai spectaculoase este creșterea rapidă a procentului acestei enzime în celulele hepatice. Acest proces contribuie la eliminarea drogului și din această cauză vor trebui mărite dozele pentru a se putea obține un efect sedativ. Această enzimă poate hidroxila și alte medicamente cum ar fi antibioticele, steroizii și anticoagulanții.

Trebuie să remarcăm că utilizarea cronică a barbituricelor scade eficacitatea multor medicamente în tratamentele medicale.

Modelarea chimică a acestei familii de enzime a fost studiată, în Franța, de către D.Mansuy la Universitatea din Paris și R.Weiss la Universitatea din Strassbourg. Regula generală poate fi ilustrată prin următoarea ecuație chimică:



Se observă că în molecula finală este încorporat un singur atom de oxigen. Acesta este argumentul pentru care o astfel de enzimă este denumită monoxigenază.

Structura unui P-450 a putut fi determinată cu exactitate. După ce a fost extras dintr-o bacterie, s-a obținut un P-450 activ prin dizolvarea lui în camfor, fiind notat cu $P\text{-}450_{CAM}$. Masa lui moleculară este 45000, iar din punct de vedere structural conține o unitate hem în centrul activ, ceea ce este în concordanță cu denumirea s-a de citocrom. Structura $P\text{-}450_{CAM}$ este prezentată în figura VIII.26.

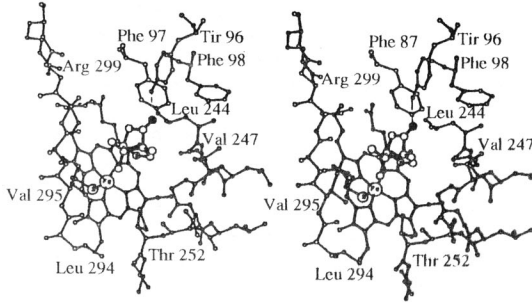


Figura VIII.26. Vedere stereoscopică a structurii centrului activ al $P\text{-}450_{CAM}$.

Analizând structura se poate recunoaște hemul, camforul și tiolatul, care constitue ligandul axial. Poate fi observat și atomul de carbon numărul 5 al camforului. Centrul activ este înconjurat de aminoacizi, protejând apa. Unul dintre ei, treonina 252 pare a fi esențial. Prin mutageneză dirijată, o treonină poate fi înlocuită cu o alanină. În acest caz apa poate pătrunde mai

ușor în centrul activ, iar formarea apei oxigenate H_2O_2 a putut fi observată la locul substratului hidroxilat.

Mecanismul transformării a fost studiat în profunzime și în prezent este acceptat următorul ciclu prezentat în figura VIII.27.

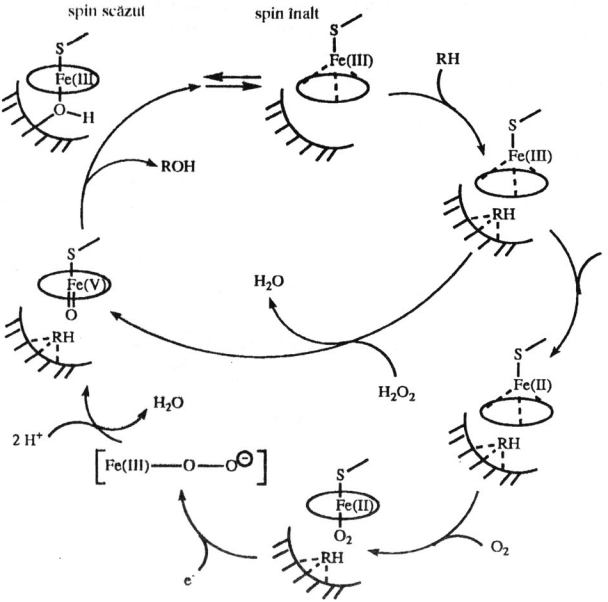


Figura VIII.27. Ciclul catalitic al citocromului P-450.

Cea mai mare parte a acestor etape au fost identificate prin metode spectroscopice. În absența substratului există un echilibru între formele Fe(III) BS și HS. Fixarea substratului deplasează echilibrul spre forma HS. Reducerea printr-un electron e^- dă o formă Fe(II) HS. Fixarea unei molecule de dioxigen O_2 dă forma Fe(II) BS ca în oxihemoglobină. A doua reducere cu un electron declașează reacția. Următoarele etape sunt ipotetice. Este posibil ca legătura Fe(V)=O să existe în starea mai oxidată a

sistemului ($P^{+\bullet}$)Fe(IV)=O, cea de a doua sarcină pozitivă fiind stocată mai degrabă pe ciclul porfirinic decât pe atomul de fer.

Mai târziu s-a descoperit o reacţie simplificată: enzima poate funcţiona plecând de la etapa Fe(III) HS, cu ajutorul apei oxigenate, evident fără electroni suplimentari. Se va obţine astfel direct forma Fe(V); această reacţie este denumită circuit peroxidic scurtat.

VIII.6.2. Bacterii cu specificitate înaltă

Unele bacterii denumite metanotrofe, folosesc metanul ca unică sursă de carbon şi deci de energie. Oxidarea metanului la metanol, care este prima etapă şi din punct de vedere chimic foarte dificilă este catalizată prin sistemul enzimatic numit "Metan-Monoxigenază" (prescurtat MMO). Reacţia este:

$$CH_4 + NADH + H^+ + O_2 = H_2O + NAD^+ + CH_3OH$$

MMO este formată din trei părţi componente: A, B şi C după cum se observă în figura VIII.28.

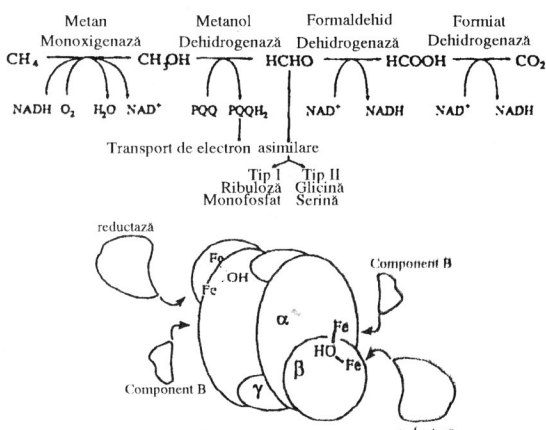


Figura VIII.28. Rolul metabolic al MMO şi structura ei cuaternară.

Componenta A este hidroxilaza propriu zisă. Ea este formată din şase subunităţi. (α_2, β_2, γ_2), masa sa moleculară fiind de 210 kDa. Pe acest component A se situează şi centrul activ, dinuclear pe bază de fer, a cărui structură nu este, cel puţin deocamdată cunoscută, dar care conţine probabil un ion hidroxil în punte. Rolul componentei B (15,7 kDa) nu este încă precizat. Componenta C sau reductaza, aduce electronii în sistem. Ea conţine o grupă FAD şi un "cluster" [2Fe-2S] şi are masa de 40 kDa. Nu i se cunoaşte structura prea bine. Mai multe grupuri de cercetare din lume, lucrează în prezent la obţinerea acestei enzime în stare cristalină, pentru o cât mai bună caracterizare.

Rezultatele spectrale cele mai recente asupra formei Fe(II) şi Fe(III), au condus la ipoteza structurală următoare, pentru centrul activ (figura VIII.29.).

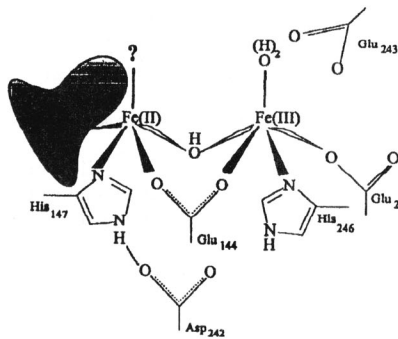


Figura VIII.29. Ipoteza structurală a lui J.Lipscomb, pentru MMO.

Această structură este asemănătoare cu aceea a centrului activ din Ribonucleotid Reductază. O diferenţă importantă este aceea că atomii de fer sunt pentacoordinaţi. Două poziţii pe atomii de fer, sunt ocupate de liganzi încă necunoscuţi. Una din aceste poziţii va fi rezervată substratului.

Caracterul captivant al MMO pentru chimişti, este că ea realizează o reacţie foarte greu de reprodus în laborator, fără a avea în structura sa un hem ca P-450.

A fost propus un mecanism de către grupul lui J.Lipscomb de la Universitatea din Minneapolis (Minnesota,SUA) (figura VIII.30.). Studiile

sunt mult mai recente decât cele pe P-450 şi acest ciclu nu trebuie considerat ca stabilit definitiv.

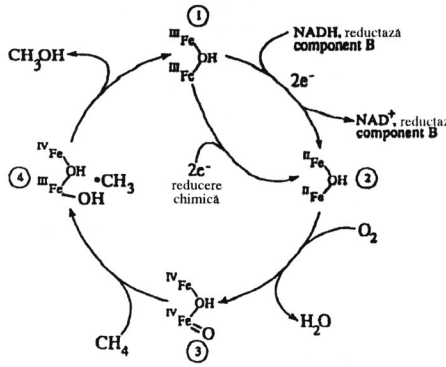


Figura VIII.30. Ciclul catalitic propus pentru MMO.

Prima etapă corespunde stării Fe(III)Fe(III) a centrului activ. Cei doi ioni Fe(III) vor fi cuplaţi antiferomagnetic la fel ca în hemeritrină, dar mai puţin puternic, ceea ce este mai favorabil realizării unei punţi hidroxo decât unei punţi oxo. A doua etapă este atinsă după reducerea cu doi electroni a centrului activ şi deci corespunde unei forme Fe(II)Fe(II). Forma Fe(II)Fe(III) poate să fie detectată în RPE, dar ea niciodată nu este abundentă, ceea ce conduce la ipoteza că echilibrul

$$Fe(II)Fe(II) + Fe(III)Fe(III) \rightleftharpoons 2Fe(II)Fe(III)$$

nu este favorabil: potenţialele redox Fe(III)Fe(III)/Fe(III)Fe(II) şi Fe(II)Fe(III)/ Fe(II)Fe(II) ar fi prea apropiate. Această formă Fe(II)Fe(II) ar fixa o moleculă de oxigen. Natura centrului activ este încă necunoscută. În figura VIII.30 a fost postulată o stare Fe(IV)Fe(IV). Ultimele etape ale ciclului corespund plecării unui $H^{\bullet}$ unui radical din CH_4 , ceea ce conduce la obţinerea unui radical metil care apoi captează $HO^{\bullet}$.

Dacă se prepară forma Fe(II)Fe(II) a enzimei ea poate să oxideze o moleculă de metan într-o singură etapă fără intervenţia reductazei. Recent

s-a demonstrat că scurtcircuitul peroxidic poate să se realizeze şi în cazul MMO-ului. Această observaţie stabileşte o punte de legătură cu P-450.

VIII.6.3. Ribonucleotid-Reductaza

O reacţie importantă în sinteza ADN-ului este transformarea ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide. Această reacţie se realizează în E.coli la nivelul difosfatului, datorită unui sistem complex numit Ribonucleotid-Reductază, a cărui funcţionare este prezentată în figura VIII.31:

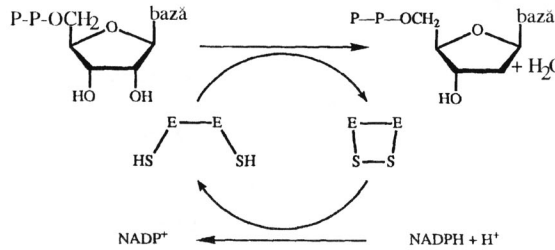
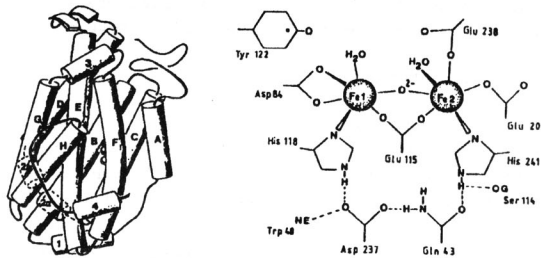


Figura VIII.31. Transformarea ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide, în prezenţa Ribonucleotid-Reductazei.

Acest sistem conţine 2 compuşi: B1 ($\alpha\alpha'$, 70 kDa) şi B2 (β_2 87,5 kDa). Subunitatea B2 conţine pe unitatea β, un radical tirosil şi un centru dinuclear. Recent, stuctura B2 a fost studiată prin difracţie cu raze X (figura VIII.32a.). Se observă uşor centrul dinuclear cu Fe. Radicalul tirosil, înclinat către elicea αC, este la 5 Å de atomul de Fe cel mai apropiat. În figura VIII.32b. este reprezentată structura centrului activ.

Ca şi în hemeritrină, cei doi atomi de fer sunt legaţi în punte printr-un ion oxo, dar din contră un singur ion carboxilat leagă aceşti doi atomi. B1 conţine cisteine şi centrele de fixare ale ribonucleotidei şi a NADH. Mecanismul de acţiune ar putea fi cel prezentat în figura VIII.33.

Funcţiile carbonil vor fi reduse de către funcţiile tiolice. Rolul complexului dinuclear de fer va fi acela de a stabiliza radicalul tirozil. Foarte recent s-au făcut progrese pentru a înţelege mecanismul de formare al radicalului (figura VIII.34).



(a) (b)

Figura VIII.32. a) structura proteinei B2 din Ribonucleotid-Reductază; b) Structura centrului dinuclear cu fer.

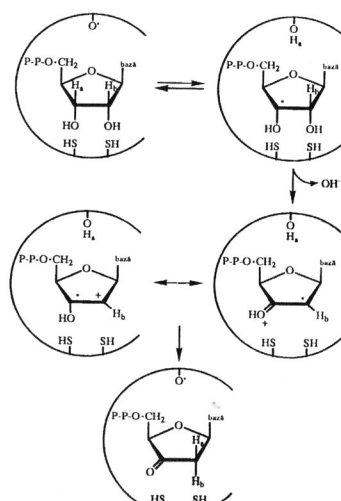


Figura VIII.33. Mecanism de acțiune pentru fixarea ribonucleotidei și a NADH, implicat în stabilizarea radicalului tirozil.

Sistemul trece printr-o etapă Fe(III)-O-O-Fe(III) care dă apoi specia Fe(III)-Z*-Fe(III) + radical tirozil. Toate aceste specii au fost detectate experimental.

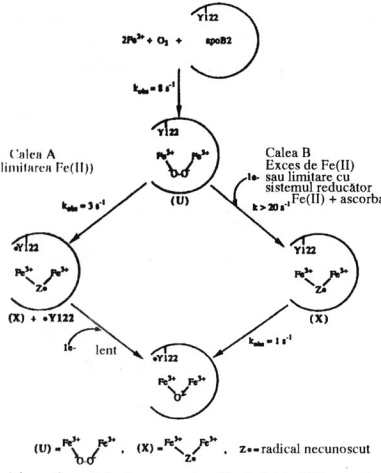


Figura VIII.34. Mecanismul de formare al radicalului în Ribonucleotid-Reductază.

În prezent această enzimă este intens studiată de numeroase colective de cercetare din lume.

VIII.6.4. Utilizarea apei oxigenate

Apa oxigenată se poate forma prin acţiunea oxidazelor. Ea poate fi utilizată de către peroxidaze care realizează reacţia:

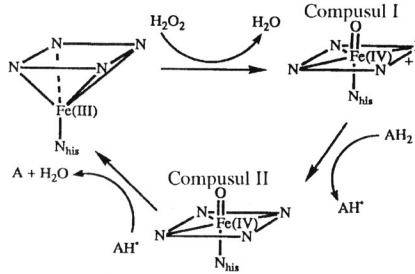
$$AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$$

Acumularea de H_2O_2 în organismele vii fiind nocivă s-au creat enzimele care catalizează descompunerea ei: catalazele. Aceşti reactanţi care utilizează un oxidant puternic cum este H_2O_2, sunt situaţi în organitele

intracelulare numite peroxizomi. Sunt întâlnite atât în lumea animală cât şi în lumea vegetală, sau în bacterii. În literatura de specialitate s-a semnalat că o specie de coleoptere se apără de adversarii săi, stropindu-i cu un jet de soluţie caldă (100°C) de p-benzochinonă. Această acţiune este rezultatul unei descompuneri rapide prin acţiunea catalitică a catalazei şi peroxidazei, a unei soluţii de 25% H_2O_2 şi 10% hidrochinonă. Presiunea în sistem este asigurată prin procesul de degajare al dioxigenului.

VIII.6.5. Peroxidazele

Ciclul catalitic este următorul:



Formal compusul I are aceeaşi stare de oxidare ca forma cea mai oxidată din ciclul citocromului P-450. Ligandul axial nu este acelaşi, dar P.L.Ortiz de Montellano a adus un număr de argumente în favoarea unei alte origini pentru această diferenţă de reactivitate. În peroxidaze gruparea Fe=O este protejată de către substrat şi reacţia de transfer a grupei oxo este inhibată. Din contră ciclul porfirinic este accesibil substratului care ar putea astfel să fie oxidat cu un electron.

$$PFe(V)=O \rightleftharpoons (P^{+\bullet})Fe(IV)=O + S \rightarrow PFe(IV) + S^{+\bullet}$$

Această teorie pare a se aplica în mod particular la peroxidaza cea mai studiată, extrasă din hrean (Horse-Radish Peroxidase, HRP), care are proprietatea de a oxida fenolii. Din păcate structura sa încă nu este cunoscută.

Singura peroxidază la care se cunoaşte structura este citocrom c-peroxidaza (CcP), care nu poate oxida molecule mai mici decât citocromul c. Structura acestei enzime este prezentată în figura VIII.35.

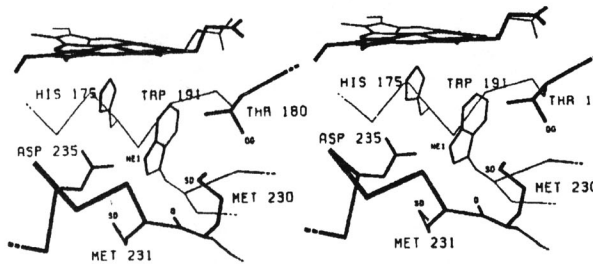


Figura VIII.35. Structura centrului activ al Citocrom c-peroxidazei.

Se poate recunoaşte cu uşurinţă hemul şi gruparea histidinică axială. În compusul I, CcP prezintă un radical care spre deosebire de HRP nu este situat pe ciclul porfirinic, ci pe un aminoacid alăturat, triptofanul 191, după cum se observă în figura VIII.35. Structura a fost dovedită prin experienţe de mutageneză dirijată şi prin spectroscopie ENDOR.

VIII.6.6. Catalazele

S-a afirmat anterior că excesul de H_2O_2 din organism este distrus de către catalaze. Aceste enzime fac parte de asemenea din sistemele hemice. Pe această cale, natura cu multă ingeniozitate conferă unor structuri chimice asemănătoare, funcţii biologice diferite. În catalază, compusul I reacţionează cu o moleculă de H_2O_2 pentru a da dioxigenul

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

În figura VIII.34. este prezentată structura unei catalaze extrasă din ficatul de vită şi caracterizată cu ajutorul metodelor fizico chimice moderne.

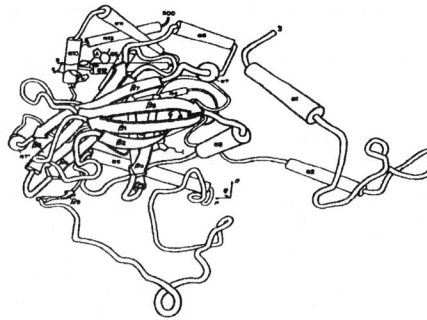


Figura VIII.36. Structura catalazei extrasă din ficatul de vită.

Structura centrului ei activ este prezentată în figura VIII.37.

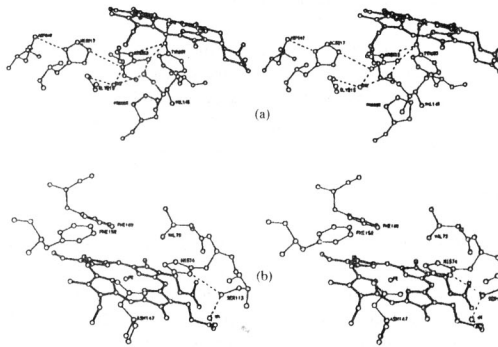


Figura VIII.37. Imagini stereoscopice ale structurii centrului activ din catalază. a) forma proximală; b) forma distală.

Se observă că atomul de fer al hemului este legat în acest caz de un radical de tirosină. Se pare că în catalaza I, ciclul porfirinic poartă electronul celibatar (identic cu HRP şi diferit de CcP).

În mod curios unele organisme vii nu pot sintetiza hemuri. Acesta este cazul bacteriei aerotolerante, Lactobacillus Plantarum. Cu toate acestea, această bacterie se poate proteja de acţiunea nocivă a apei oxigenate cu ajutorul unei "pseudocatalaze" care nu conţine hem, dar care se pare că are ca centru activ o unitate dinucleară Mn(III)-O-Mn(III), analoga entităţilor ferice întâlnite în hemeritrină, MMO sau Ribonucleotid-Reductază. O pseudocatalază analogă există într-o bacterie capabilă să suporte temperaturi ridicate. Această ultimă pseudocatalază a putut fi obţinută în stare cristalizată şi caracterizată prin radiocristalografie de către Veinstein. În structura preliminară prezentată în figura VIII.38 sunt prezentate centrele active care conţin atomi de mangan.

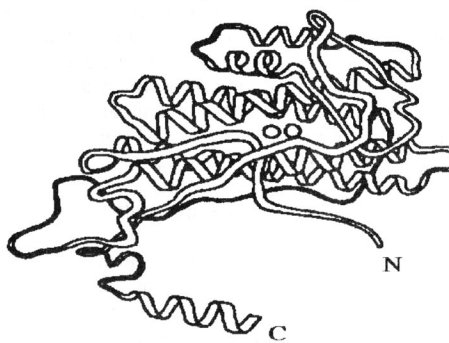


Figura VIII.38. Structura preliminară a pseudocatalazei.

Se poate remarca un anumit paralelism între sistemele hemice şi nehemice conform datelor prezentate în tabelul VIII.7.

Tabelul VIII.7. Prezentarea comparativă a sistemelor hemice şi nehemice.

Funcţia	Sistem hemic	Sistem nehemic
fixarea O_2	hemoglobină,mioglobină	hemeritrină
mono-oxigenază	P-450	MMO
catalază	catalază	pseudocatalază
peroxidază	CcP, HRP	?

Natura pare a fi inventat două tipuri de sisteme pentru a ajunge până la stările foarte oxidate: fie hemurile, fie sistemele dimetalice. În ambele sisteme echivalenţii oxidaţi sunt împărţiţi între două centre diferite: pe de o parte un ion metalic şi pe de altă parte o porfirină, un aminoacid sau un al doilea ion metalic.

VIII.6.7. Modelarea chimică a mono-oxigenazelor

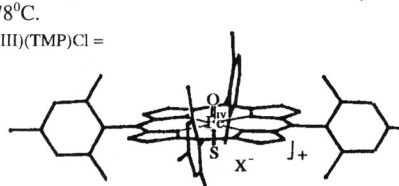
Reacţiile citate anterior, printre care hidroxilarea legăturilor C-H, sunt în mod evident de foarte mare interes pentru chimistul bioanorganician: transformarea legăturii C-H în C-OH deschide calea unor numeroase reacţii. Au fost abordate două tipuri de cercetări pentru elucidarea completă a acestora. În primul rând au fost obţinute soluţii, care permit să se furnizeze modele structurale şi electronice pentru a înţelege mecanismul de acţiune al enzimei (modelare structurală şi electronică). În al doilea rând, alte lucrări de cercetare simulează reactivitatea enzimei (modelare funcţională). Cercetările sunt deosebit de avansate în ceea ce priveşte modelarea enzimelor P-450 şi MMO.

VIII.6.7.1. Citocromul P-450. Modelare structurală

Forma cea mai spectaculoasă a ciclului enzimatic al P-450 este fără nici o îndoială specia Fe(V)=O, despre care s-a văzut că poate fi considerată în egală măsură ca o specie P$^{+\bullet}$Fe(IV)=O.

Tetramezitilporfirina cu Fe(II) a fost utizată pentru a ajunge la o asemenea specie. Reacţia următoare a fost observată în prezenţa unui donor de oxigen la -78^{0}C.

Fe(III)(TMP)Cl =



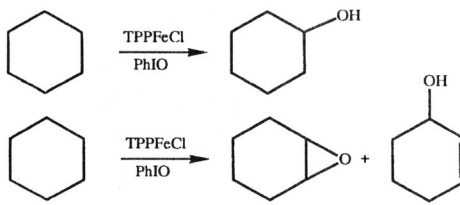
Compusul nu a putut fi obţinut în stare cristalină, dar a putut fi caracterizat prin EXAFS. Distanţa Fe-O de 1,6 Å a fost identificată şi este compatibilă total cu structura propusă. Studii spectrale au evidenţiat o stare

electronica S = 3/2, caracteristică cuplajului feromagnetic al ionului Fe(IV)BS ($S_{Fe(IV)}$ = 1) şi un radical porfirinic (S_p =1/2).

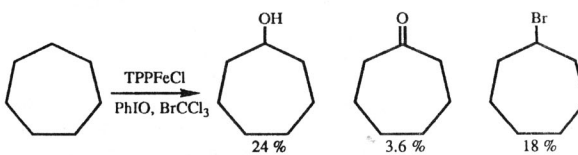
Se pare deci că starea oxidată a sistemului P-450 sau HRP, a fost reprodusă într-un mod acceptabil de către chimişti. Aceste rezultate au fost obţinute de către J.T.Groves şi R. Weis.

VIII.6.7.2. Citocromul P-450. Modelarea funcţională

În anii 70', s-au obţinut rezultate încurajatoare în imitarea reactivităţii citocromului P-450, utilizând tetrafenil porfirina cu Fe(III) (TPPFeCl) şi iodozilbenzen (PhIO) ca donor de oxigen.



O dovadă interesantă a caracterului radicalic a penultimei etape din ciclul citocromului P-450 şi a modelelor, a fost reacţia cu cicloheptanul:



Radicalul poate atrage uşor $Br^{\bullet}$ din triclorbrom metan, formând derivatul bromurat.

Progrese deosebite în această direcţie au fost obţinute prin utilizarea unor porfirine optic active, sintetizate conform schemei din figura VIII.39.

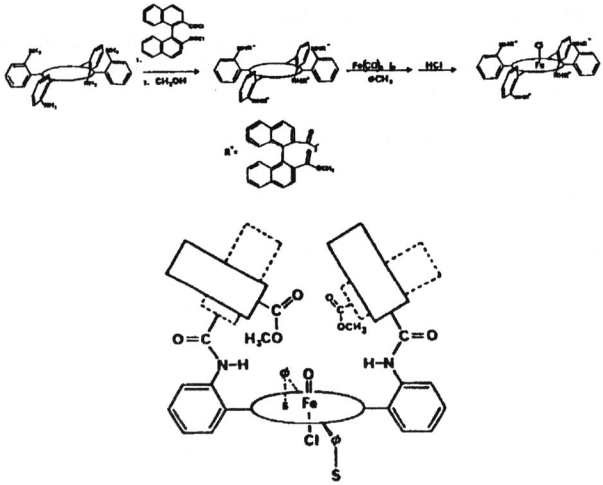


Figura VIII.39. Sinteze şi structura unei porfirine cu activitate optică.

Utilizând stirenul, Groves şi colaboratorii au putut obţine epoxidul cu un execes în produşi enatiomeri de 31%,folosind iodozilbenzenul. Evident se pot face o serie de obiecţii asupra lucrărilor precedente, care utilizează o sursă specială de oxigen şi nu dioxigenul. Această reacţie este mai dificilă, dar cu toate acestea, D.Mansuy, a reuşit punerea la punct a sistemelor funcţionale, utilizând o porfirină cu mangan, Zn ca agent reducător, CH_3COOH ca sursă de protoni şi N-metilimidazolul drept cocatalizator. Cercetările pe această temă continuă şi astăzi, industria chimică fiind interesată în special de această funcţionalitate a legăturii C-H, nu atât pentru alcanii simpli, cât pentru moleculele sofisticate de interes farmaceutic.

VIII.6.7.3. Modelarea MMO-ului şi a RNR

S-a menţionat în studiul hemeritrinei că, observarea în această proteină,a unui centru activ format din doi atomi de fer legaţi în punte de

un ion oxo şi doi ioni carboxilat, a stimulat cercetările asupra compuşilor de coordinaţie dinucleari cu Fe în punte oxo. Bineînţeles că, identificarea centrilor activi asemănători în MMO şi RNR, a accentuat aceste cercetări. În particular, punerea la punct a unui sistem neporfirinic cu fer, capabil să catalizeze oxidarea alcanilor, a fost o descoperire remarcabilă atât din punct de vedere fundamental cât şi aplicativ.

O etapă esenţială detectată în ciclul RNR, este interacţiunea între sistemul Fe(II)Fe(II) şi O_2 pentru a da o formă peroxo Fe(III)-O-OFe(III). În această privinţă, L.Que a obţinut recent un model foarte interesant. Complexul [Fe_2(N-Et-HPTB)(OBz)]$^{2+}$ reprezentat în figura VIII.40, care conţine doi ioni de Fe(II), un ligand complicat N-Et-HPTB$^-$, format din patru grupări de benzimidazol şi un grup alcoxo (un monoanion) şi un ion benzoat (OB_z^-).

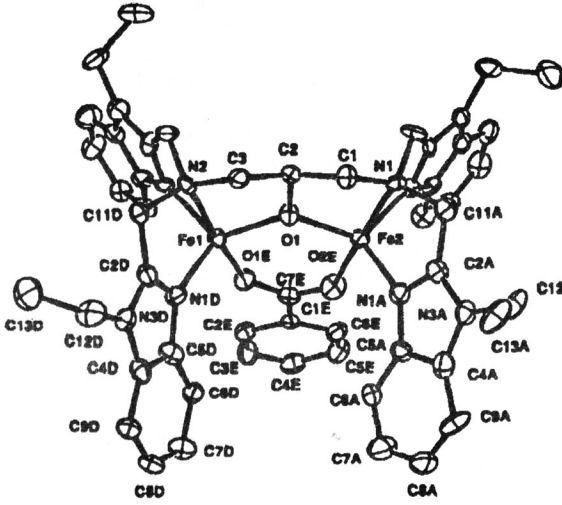


Figura VIII.40. Structura complexului [Fe_2(N-Et-HPTB)(OBz)]$^{2+}$ ce conţine doi ioni de Fe(II).

Se observă că, Fe(II) din acest sistem este pentacoordinat. Acest complex, dizolvat în CH_2Cl_2, în lipsa aerului, (sub argon) este galben. Când o cantitate controlată de O_2 este introdusă la -60^{0}C, soluția devine albastră intens cu λ_{max} = 588 nm, după cum se observă în figura VIII.41.

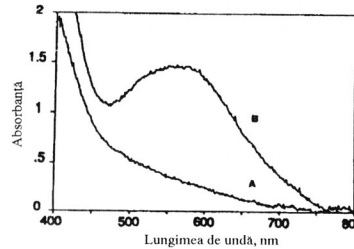
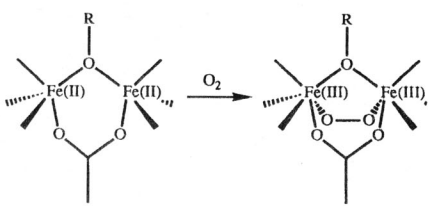


Figura VIII.41. Modificările în spectrul de absorbție în vizibil, după transformarea Fe(II)Fe(II)- spectrul A, în Fe(III)-O-O-Fe(III) - spectrul B.

Toate cercetările referitoare la aceste reacții, converg spre concluzia că reacția de formare a unui complex oxo, decurge astfel:



Acest complex este considerat ca un model structural și spectroscopic foarte bun, pentru RNR și MMO.

În final, complexul $HB(pz)_3Fe(III)O(CH_3COO)_2Fe(III)(pz)_3BH$, citat anterior ca model pentru hemeritrină, s-a dovedit a fi capabil să oxideze adamantanul și ciclohexanul în alcoolii și cetonele lor, în prezența de zinc, acid acetic și dioxigen. În acest domeniu cercetările continuă activ și în prezent.

CAPITOLUL IX

METALOPOLINUCLEOTIDE

IX.1. Aspecte generale

În literatura de specialitate până în anii '70 a fost acordată mult mai multă atenţie metaloproteinelor, faţă de metalopolinucleotide, care sunt de fapt compuşii de coordinaţie ai acizilor nucleici.Acest fapt poate fi explicat prin aceea că, numai în ultimul timp, datorită succeselor biologiei moleculare, a fost clarificat rolul important pe care îl joacă acizii nucleici în viaţa organismelor vii.

Funcţiile metalelor, care intră în structura acizilor nucleici au fost neclare până nu de mult, deoarece prezenţa lor în sistem era catalogată ca „impuritate".

Intre timp, cercetările efectuate arată că metalele care intră în structura metalopolinucleotidelor, joacă un rol foarte important în stabilirea structurii spiralate a ADN-ului, în formarea anumitor conformaţii a acestui biopolimer şi deci în procesele sintezei proteice.

Deosebit de interesante sunt investigările legate de acţiunea preparatelor chimioterapeutice anticancerigene, care au o acţiune directă asupra acidului dezoxiribonucleic, care „deprimă" unele procese cum ar fi procesul de diviziune celulară şi „stimulează" altele cum ar fi procesul de „creştere" celulară.

Cei mai mulţi cercetători care lucrează în domeniu, consideră că cele mai eficiente preparate anticancerigene „leagă" în diferite moduri, foarte strâns, lanţurile de polinucleotide între ele.

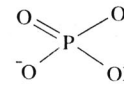
Lanţurile polinucleotidelor sunt construite din nucleotide cu diferite structuri.Fiecare nucleotid, după cum s-a prezentat şi în capitolele anterioare, conţine trei componenţi:

B - R - P

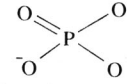
- unde B este baza heterociclică cu azot purinică sau pirimidinică legată printr-un atom de N cu un rest de hidrat de carbon;

- unde R este un rest de hidrat de carbon, riboză în cazul ARN-ului şi dezoxiriboză sau riboză redusă în cazul ADN-ului; restul R este legat covalent de baza heterociclică cu azot şi cu două grupări fosfat;

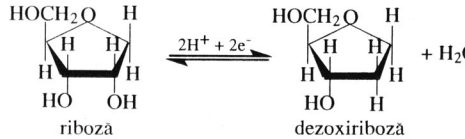
- unde P este restul de acid fosforic



legat la rândul său cu restul de riboză sau dezoxiriboză.Atomul de hidrogen din gruparea OH a acidului fosforic poate disocia relativ uşor, cu formarea în final a anionului fosfat:

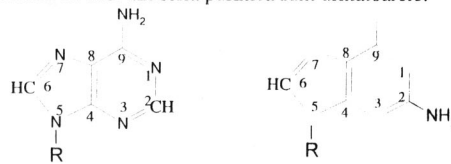


Resturile de hidrat de carbon sunt notate cu R şi au următoarea structură:

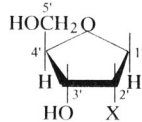


riboză dezoxiriboză

Bazele heterociclice cu azot din seria purinică sunt următoarele:



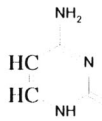
Adenina Guanina

R=  : nucleozid (X = OH: riboză ; X = H: dezoxiriboză)

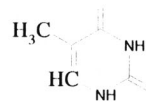
După cum se poate observa ambele baze heterociclice au nucleele imidazolice identice (4,5,6,7,8). Atomi identici se situează în poziţiile 1,2,3 şi 9 dar substituenţii din poziţiile 2 şi 9 sunt diferiţi: -H şi -NH, în molecula

adeninei şi -NH_2 şi -OH în molecula guaninei. Bazele pirimidinice dintr-un lanţ, formează legături de hidrogen cu bazele pirimidinice din lanţul vecin. La formarea lor participă atomul de N_1 şi grupările -NH_2 şi -OH din guanina de la atomul C_9.

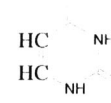
Fragmentul -N=CH-OH poate suferi o regrupare tautomeră cu formarea gruparii -NH-C=O. Bazele seriei pirimidinice sunt următoarele:



Citozina

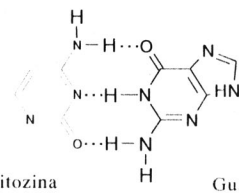


Timina



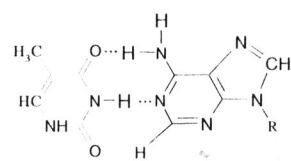
Uracil

În spirala dublă a ADN-ului citozina este legată prin trei legături de hidrogen cu guanina:



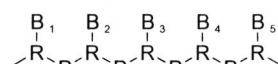
Citozina Guanina

Timina, în aceeaşi elice dublă a ADN-ului se leagă prin două legături de hidrogen cu adenina



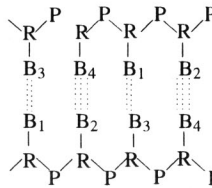
Timina Adenina

Formula generală a moleculei mari de acid nucleic poate fi reprezentată în felul următor



În cazul ADN-ului, B_1, B_2, B_3, B_4, B_5 etc sunt bazele heterociclice cu azot menţionate (adenină, guanină, citozină şi timină); iar în cazul ARN-ului B_1, B_2, B_3, B_4, B_5 etc sunt aproape aceleaşi baze cu azot, dar timina este înlocuită cu uracil care diferă de timină prin absenţa grupării metilenice.

Dacă notăm adenina şi guanina cu B_1 şi B_2 iar citozina şi timina cu B_3 şi B_4, legăturile chimice de hidrogen stabilite în lanţul dublu pot fi prezentate schematic astfel :



Lanţul dublu, formează de fapt o elice dublă cu un diametru de 20 Å şi lungimea elicei 34,6 Å. Elicea spiralei conţine 10 unităţi monomere. În „interiorul" spiralei duble se află bazele heterociclice cu azot legate unele de altele prin legături de hidrogen iar în exterior grupările fosfatice care, disociind acid, formează un „strat" al atomilor de oxigen purtători de sarcină negativă. Datorită repulsiei reciproce a acestor straturi de atomi, la creşterea temperaturii are loc distrugerea legăturilor de hidrogen care asigură structura de elice dublă, acidul nucleic trecând într-o formă dezordonată.

Distrugerea legăturilor de hidrogen din acizii nucleici izolaţi, poate fi observată într-un interval îngust de temperatură, fenomenul fiind denumit „topirea" structurii regulate intramoleculare. Acest transfer de fază a ADN-ului poate fi observat prin modificarea absorbţiei în regiunea UV a spectrului, la 260 nm; în timpul denaturării ADN-ului are loc un efect hipercromic. Resturile de riboză, care intră în structura macromoleculelor de ARN, diferă de resturile de dezoxiriboză, prin prezenţa grupărilor hidroxil libere (pe fiecare unitate monomeră revine o grupare OH) iar în locul timinei, în aceste unităţi monomere intră uracilul.

Din cauză că macromoleculele ARN-ului sunt foarte hidrofile, lanţul macromolecular polinucleotid este deosebit de flexibil formând în unele locuri un lanţ dublu, preluând o structură secundară şi terţiară destul de complexă şi deosebit de mobilă.

Acizii nucleici pot fi consideraţi ca nişte polielectroliţi tipici, purtători de un număr mare de sarcini negative (câte o sarcină negativă pe fiecare anion de nucleotid monomer). Concentraţia şi natura cationilor prezenţi în soluţiile de polinucleotizi influenţează deosebit de mult proprietăţile fizice ale acizilor nucleici.

Aceste proprietăţi sunt:

— configuraţia macromoleculelor (este vorba în primul rând de configuraţia macromoleculelor ARN-ului);

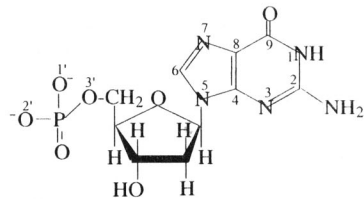
— viteza de sedimentare,

— vâscozitatea soluţiilor de acizi nucleici şi în final proprietăţile spectrale.

Spectrele de absorbţie ale ADN-ului ne dau informaţii nu numai despre proprietăţile fizice ale acestuia ci şi despre cele chimice. Anterior (capitolul 5) a fost menţionat faptul că densitatea optică a soluţiilor de ADN creşte cu ruperea legăturilor de hidrogen care leagă două lanţuri în spirala dublă. Se presupune că la reţinerea cationilor din fluidul biologic de către stratul exterior cu sarcină negativă, repulsia electrostatică între straturile de macromolecule de ADN scade, acestea fiind legate mai strâns, fapt ce duce la „creşterea" temperaturii „de topire" a ADN. În situaţia în care ionii metalici din mediu se leagă de atomii de azot (N) sau oxigen (O) care intră în structura bazelor heterociclice cu azot ce participă la formarea legăturilor de hidrogen, temperatura „ de topire"a ADN-ului scade.

În concluzie modificarea temperaturii de „topire" şi apoi modificarea spectrelor de absorbţie poate fi explicată prin formarea legăturilor chimice între biocationii metalici şi acizii nucleici.

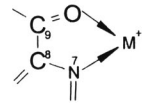
Structura unei unităţi monomere a ADN - ului este următoarea:



Ionii metalici pot să se „lege" cu diferiţi atomi donori ai monomerului de nucleotid. Este posibilă o legătură monodentată a ionului metalic cu atomul de oxigen ionizat din gruparea [PO_4 (O-(1'))] şi cu atomi liberi de N (N-(7), N-(3)) a heterociclilor respectivi; este posibilă şi

formarea legăturii chimice între ionii metalelor tranziţionale şi atomii de N sau O care participă la formarea legăturilor de hidrogen.

Legătura bidentată sau chelată a ionilor metalici poate fi stabilită cu participarea diferenţiată a nucleotidei cu formarea în special a ciclurilor de 5 membri de tipul:



Unii autori consideră că este posibilă apariţia în sistem a legăturilor chelate de tip:

$$(N\text{-}(7)...M^{z+}...O^{-}\text{-}(1'))$$

cu formarea unui macrociclu de 11 atomi, care implică introducerea biocationului în macrociclu.

În afară de aceste legături se mai pot forma şi legături chimice de tip:

$$-O^{-}...M^{z+}...O^{-}-$$

între grupările fosfat care aparţin la două nucleotide vecine şi legături între lanţuri de tipul :

Deci , în final, se poate afirma că există o multitudine de moduri de coordinare a biocationilor cu o biomoleculă de acid nucleic. Modurile de coordinare sunt prezentate în tabelul IX.1.

Aceste 12 moduri de coordinare nu pot reda însă toate posibilităţile de coordinare a biocationilor cu polinucleotidele.

O etapă destul de importantă pentru caracterizarea compuşilor coordinativi ai biocationilor cu polinucleotidele este stabilirea stoechiometriei lor. În calitate de unitate structurală se alege un rest de nucleotid (un monomer). Dacă ionul metalic coordinează cu două nucleotide (modurile de coordinare IX-XII) raportul stoechiometric este $c_M/c_{nucleotid}= 0,5$. În unele cazuri acest raport poate fi egal cu unitatea. Dacă doi biocationi sunt legaţi cu acelaşi nucleotid, dar prin moduri diferite,

raportul stoechiometric între concentrațiile biocationului (C_M) și nucleotidului ($C_{nucleotid}$) $c_M/c_{nucleotid}$= 1,5 - 2 .

Tabel IX.1. Moduri de coordinare ale biocationilor cu acizii nucleici

Coordanare monodentată		Coordanare bidentată	
Mod	Atomi implicați	Mod	Atomi implicați
I	O (1)		în interiorul nucleotidei
II	N(7)	VII	N(7) ... C(9)-O
III	N(3)	VII	N(7) ... O⁻(1')
IV	N(1)		între nucleotide
V	C(2)-N	IX	O⁻(1') ... O⁻(1'')
VI	C(9)-O	X	N(7) ... N(3)
			între lanțuri
		XI	N(1) ... N(2)
		XII	N(1) ... O⁻(2')

În numeroase cazuri, determinarea stoechiometriei metalopolinucleotidelor este dificilă, deoarece compușii formați disociază ușor în mediu. Gradul de disociere al metalopolinucleotidelor este determinat în primul rând de constanta de stabilitate, care în cazul cel mai simplu este redată prin relația:

$$K_{stabilitate} = \frac{\left[M_{legat}\right]}{[M][nucleotid]} \qquad (IX.1)$$

În această relație $\left[M_{legat}\right]$ este concentrația biocationilor legați cu polinucleotidul; [M] — concentrația biocationilor din soluție; [nucleotid] concentrația nucleotidului nelegat de biocation.

În relația IX.1 mărimea $\left[M_{legat}\right]$ se determină „aproximativ". Dacă toți biocationii se leagă prin același mod de coordinare, termenul $\left[M_{legat}\right]$ are un sens determinat, iar dacă modurile de coordinare ale biocationilor diferă, este necesar să se calculeze atâtea constante de stabilitate locale câte moduri de legare chimică apar.

Într-o primă „aproximare" se pot reține două tipuri mai importante de interacțiune chimică a biocationului cu atomii donori din bioliganzii de acest tip: cu atomii de N (modurile de coordinare II-V, X, XI și parțial VII-IX) și cu atomii de O ai grupărilor fosfat (modul de coordinare I - IX).

Prin cercetările efectuate asupra compușilor coordinativi ai cuprului și ferului cu ADN-ul au fost observate diferențe destul de mari între constantele de stabilitate locale atât în cazul primului mod de complexare cât și în cazul celui de-al doilea.

IX.2. ADN și endonucleazele artificiale

După o scurtă prezentare referitoare la aspectele moleculare ale activității hidrolitice ale *nucleazelor* și enzimelor de restricție (limitare), în acest capitol se prezintă, mecanismul de acțiune al *bleomicinei*, un medicament anticanceros, capabil să separe ADN-ul celulelor tumorale în prezența ferului, oxigenului molecular și a unei surse de electroni. Acest produs natural i-a inspirat mult pe chimiști în sinteza compușilor de coordinație, având proprietatea de a separa lanțurile aciziilor nucleici pe calea oxidării resturilor de dezoxiriboză ai ADN-ului. În prezent unele *endonucleaze* artificiale sunt utilizate ca instrument de lucru în biologia moleculară, mai ales pentru proprietățile lor citotoxice dirijate împotriva celulelor canceroase sau împotriva virușilor.

Vom încerca să dăm un răspuns plauzibil la următoarele întrebări:

1. De ce Natura a utilizat grupările fosfodiesterice ca verigi de legătură între unitățile de dezoxiriboză din ADN ?

2 Care este mecanismul hidrolizei ADN-ului prin intermediul *nucleazelor* și al *enzimelor de restricție* ?

3. Cum separă ADN-ul prin procesele de oxidare ale zaharurilor? Care este strategia de elaborare a *endonucleazelor artificiale* ?

4. Care este mecanismul de acțiune al *bleomicinei* ?

5. Care este rolul compușilor de coordinare Fe-EDTA ca agenți de afinitate și ca instrument de lucru în biologia moleculară ?

6. Care este rolul metaloporfirinelor cationice în activitatea nucleazei? Care este mecanismul lor de acțiune și ce activitate biologică au?

1. Nucleotidele care se succed în ADN și ARN sunt legate covalent unele de altele prin punți fosfat: fiecare grupare -OH din poziția 3 a dezoxiribozei (sau ribozei) este legat la gruparea -OH din poziția 5 a nucleotidului următor printr-o legătură fosfodiesterică. Se disting două canale de mărime diferită, după cum se observă în figura IX.1.

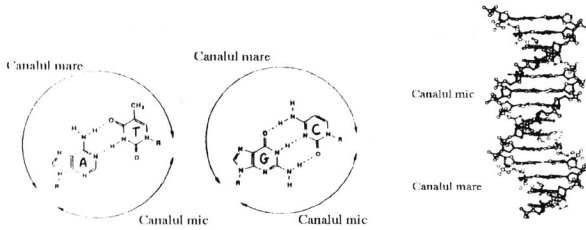


Figura IX.1. Structura de dublă elice a ADN-ului cu cele două canale.
(cap IX.1a şi cap IX1b)

Legăturile fosfor-oxigen formate, sunt greu de disociat: pe de o parte energia de legătură P-O este de 351,12 kJ/mol (legătura C-O are 284,24 kJ/mol) şi pe de altă parte hidroliza fosfodiesterilor este foarte, foarte lentă); timpul de înjumătăţire al reacţiei de hidroliză a legăturilor fosfodiesterice din ADN este estimat la 200 milioane de ani la pH = 7 la 25^{0}C. Deci nu este surprinzător că natura a ales utilizarea legăturilor fosfodiesterice, pentru a „proteja" informaţia conţinută în acizii nucleici.

Din contră, necesitatea recombinării secvenţelor acizilor nucleici şi apărarea fiecărui organism împotriva acizilor nucleici exogeni a obligat evoluţia (natura) să pună la punct instrumente extrem de eficace pentru a hidroliza aceleaşi legături fosfodiesterice. Hidrolazele ADN-ului ("DN-aze") sunt capabile să elibereze în câteva secunde funcţiile 3'-OH şi 5' – O – PO_3^{2-} (unele nucleaze eliberând extremităţile 5'-OH şi 3'-fosfat, ca în cazul DN-azei II, după cum se observă în figura IX.2). Majoritatea DN-azelor cum ar fi ribozimele, utilizează drept cofactori ionii metalici.

2. Structura tridimensională a celor mai multe nucleaze a putut fi determinată şi experimental. Este cazul DN-azei I şi a enzimei de restricţie Eco RI.

De asemenea, este posibilă înţelegerea la nivel molecular a naturii interacţiei proteină-ADN, ce permite accelerarea de ordinul a 10^{14} ori a hidrolizei unei legături P-O, la pH fiziologic.

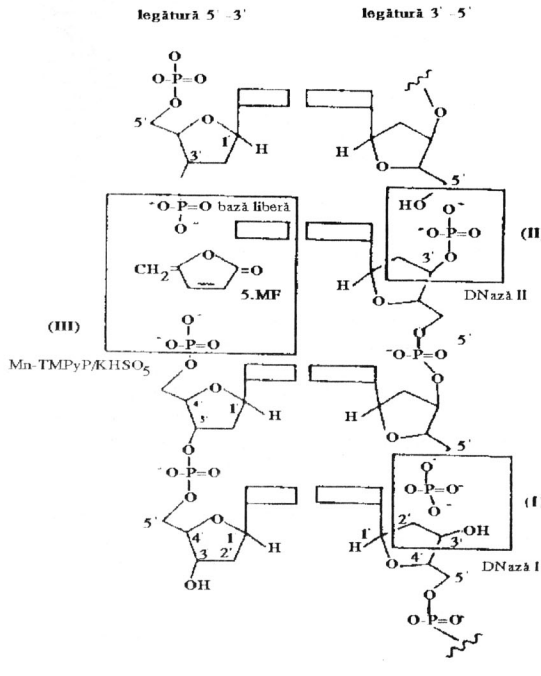


Figura IX.2. Ruperea ADN-ului indusă de către DN-aza I, DN-aza II sau de către nucleaza chimică „Mn-TMPyP/$KHSO_5$.

În cazul DN-azei I, cataliza acido-bazică este asigurată de un rest de histidină (H 131) sprijinită prin funcţia carboxilică a unui acid glutamic vecin (E 75). Înteracţiunea unui ion de calciu cu gruparea fosfat contribuie la deformarea geometriei tetraedrice a acestuia, favorizând astfel atacul moleculei de apă şi ruperea legăturii P-$O^{5'}$ (figura IX.3).

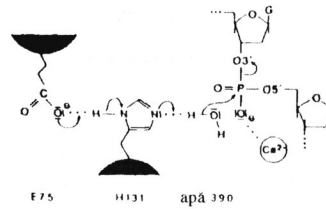


Figura IX.3. Mecanismul hidrolizei unei legături P-O catalizată de DN-aza I.

O etapă complementară în înțelegerea mecanismului de hidroliză a ADN-ului, a fost depășită prin determinarea structurii complexului Eco RI/duplex (TCGCGAATTCGCG). El acționează, la una din primele structuri ale complexului proteină/ADN. Cele 12 legături de hidrogen între proteină și secvența GAATTC, contribuie la recunoașterea țintei și la deformarea oligonucleotidei în vecinătatea locurilor unde are loc separarea.

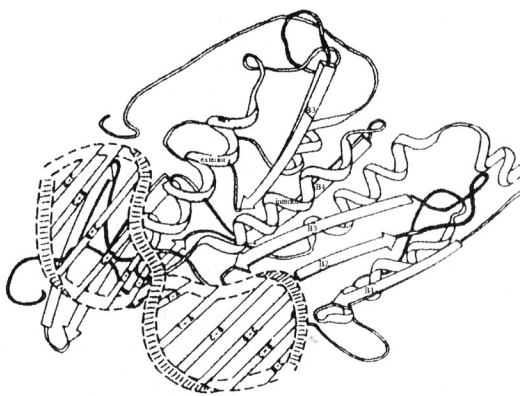


Figura IX.4. Reprezentarea schematică a interacției unei subunități a enzimei de restricție Eco RI și a țintei de ADN dublă elice.

|
5'-GAATTC-3'

3'-CTTAAG-5'
|

Separarea lanțului dublu a ADN-ului este simetrică față de un centru și compatibilă cu structura de dimer a proteinei. Printre nucleaze, se disting endonucleazele (hidroliza se poate face în mijlocul firului) și exonucleazele-3' (exonucleaza III din *Escherichia Coli*) sau -5' (nucleaza din *Baccillus subtilis*). Enzimele de restricție sunt nucleaze ale bacteriilor, capabile să recunoască o secvență particulară a unui ADN exogen (aceeași secvență a genomului bacterian este protejată prin metilare). Utilizarea enzimelor de restricție și a ligazelor, capabile să reunească fragmente rezultate din procesele de restricție, au permis dezvoltarea recentă a ingineriei acizilor nucleici (clonare, exprimarea unei gene într-o bacterie sau o levură).

3. Cum separă ADN-ul prin procesele de oxidare ale zaharurilor? Care este strategia de elaborare a *endonucleazelor artificiale*? Două probleme au orientat chimiștii și biochimiștii spre punerea la punct a agenților de rupere a ADN, prin oxidarea unităților de dezoxiriboză: activitatea foarte scăzută a compușilor cobaltului sau ruteniului în hidroliza ADN-ului și îndeosebi, descoperirea activității de nuclează a bleomicinei (antibiotic antitumoral, capabil să separe ADN-ul prin oxidarea unei legături C-H din dezoxiriboză). Contrar acțiunii radiațiilor ionizante, oxidarea ADN-ului prin forma activă a bleomicinei, este mai orientată către unitățile de monozaharid ale acizilor nucleici decât spre bazele heterociclice cu azot. Efectul radiațiilor ionizante asupra celulelor normale, constă în numeroase modificări, prin oxidarea macromoleculelor biologice și în mod particular a ADN-ului. Aceste oxidări au ca rezultat smulgerea electronilor din bazele heterociclice și a atomilor de hidrogen din unitățile de monozaharid sau din bazele heterociclice cu azot. Speciile radicalice astfel formate pot reacționa apoi cu dioxigenul dizolvat intracelular. Ca exemplu, citâm unul din produșii clasici formați după oxidarea guaninei din ADN: 8-hidroxiguanozina (forma dominantă în soluție este 8-oxo-7,8-dihidroguanozină). La originea apariției defectelor prin oxidarea bazelor heterociclice cu azot din ADN sunt alte reacții: formarea radicalilor hidroxil prin reacția lui Fenton sau generarea de oxigen singlet prin transferul de energie a unui fotosensibilizator în stare excitată, către dioxigenul molecular intracelular.

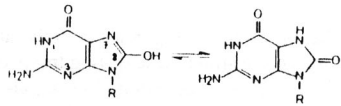


Figura IX.5. Echilibrul între 8-hidroxiguanozina și 8-oxo-7,8-dihidroguanozina.

Oxidarea selectivă a dezoxiribozelor din ADN, ca strategie de punere la punct a nucleazelor artificiale, este de fapt modelarea mecanismului de acțiune a unui medicament antitumoral: bleomicina, care va fi discutat în continuare.

4. Mecanismul de acțiune al *bleomicinei.* Bleomicina (BLM) este un antibiotic produs de *Streptomices vergitilus,* ale cărei proprietăți citotoxice au fost descoperite în 1966 în Japonia (de fapt „bleomicina" utilizată în clinica umană, este un amestec de 70% A_2 și 30% B_2 după cum se observă în figura IX.6.)

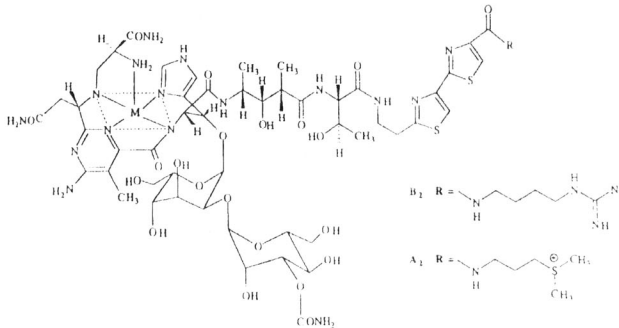


Figura IX.6.. Structura bleomicinei metalate.

Această moleculă face parte, împreună cu antraciclina și cu compusul de coordinație cis-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ sau complexul [cis-diaminodicloro platinic], dintre medicamentele importante utilizate în chimioterapia anticanceroasă. Citotoxicitatea BLM este atribuită separării (fragmentării) ADN-ului pe care o provoacă „in vivo". Aceasta solicită trei

cofactori: un ion metalic (cel mai eficace este ferul), oxigenul molecular şi doi electroni .

Structura BLM joacă un rol important în activitatea de nuclează a acestui medicament. În această structură se disting trei părţi:

— un rest bitiazol şi un lanţ terminal cu o sarcină pozitivă care asigură o afinitate puternică pentru locurile GC din ADN dublă elice ($K_{afinitate} = 10^8$ moli^{-1});

— resturi de pirimidină, β-amino-alanină şi β-hidroxi-imidazol, capabile să complexeze foarte puternic ionii metalici (partea chelatantă a moleculei);

— un dizaharid esenţial pentru penetrarea celulară .

În prezenţa electronilor, a oxigenului molecular şi a ionilor ferici, forma „activată" a bleomicinei rupe ADN-ul B prin smulgerea atomului de hidrogen din poziţia 4' a unităţii de dezoxiriboză (figura IX.7.).

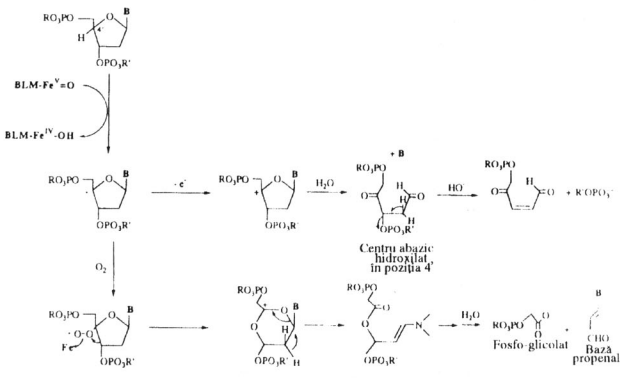


Figura IX.7. Mecanismul oxidării atomului de carbon 4' din dezoxiriboza ADN-ului prin BLM activată.

Radicalul format pe carbonul 4' poate reacţiona cu dioxigenul (cale „oxigen-dependentă") sau este oxidat la cation, ceea ce conduce la un centru abazic. În primul caz, o rearanjare a radicalului peroxidic

intermediar duce la ruperea elicei ADN-ului şi la formarea de baze propenale (după cum se observă în figură), trei atomi de carbon ataşaţi la bază provenind din poziţiile 1', 2' şi 3' ale dezoxiribozei.

4.1. Care este natura bleomicinei „activate" ?

Prima ipoteză asupra mecanismului de acţiune a BLM-ului a fost aceea de a considera că acest complex BLM-Fe(II), format după readucerea BLM-Fe(III) nu este responsabil de formarea radicalilor hidroxil $HO^{\bullet}$ care provin din procesele de reducere ale oxigenului molecular (formarea anionului superoxid sub acţiunea BLM-Fe(II), dismutarea $O_2^{\bullet -}$ şi reacţia Fenton între BLM-Fe(II) şi apa oxigenată formată). Totuşi, două rezultate experimentale sunt în dezacord cu această ipoteză:

— în cazul fragmentării ADN-ului prin acţiunea radicalilor hidroxil, secvenţele sunt desfăşurate pe 5 până la 6 perechi de baze, acestea fiind puternicdeteriorate, ceea ce nu se constată în cazul bleomicinei.

— tăria efectului izotopic, observat pentru extragerea atomului de H din poziţia 4' este apropiată de valorile observate la hidroxilarea legăturilor C-H, catalizată de monoxigenaze de tipul citocromului P-450. Această ipoteză se bazează pe faptul că formarea BLM-ului se face conform unei stoechiometrii analoge cu cea a citocromului P-450: 2 electroni şi o moleculă de dioxigen sunt necesare pe unitatea de BLM-Fe(III).

$$R-H + O_2 + 2H^+ \xrightarrow{P-450} R-OH + H_2O$$

După această ipoteză, specia activă responsabilă de oxidarea dezoxiribozelor ADN-ului va fi o unitate „bleomicină-Fe-oxo" cu un grad înalt de oxidare (BLM-Fe^{V}= O sau $BLM^{\bullet +}$-Fe^{IV}= 0 după cum se observă în figura IX.8).

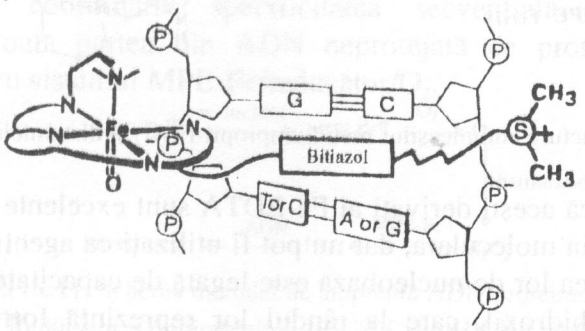


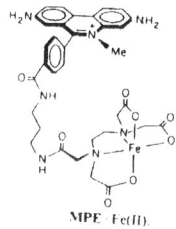
Figura IX.8. Reprezentarea schematică a bleomicinei activate în interacţie cu ADN-ul (lanţ dublu).

Această metodă de activare a BLM-ului a fost confirmată in vitro, utilizând un donor de atomi de oxigen, cum ar fi monopersulfatul de potasiu, $KHSO_5$, în separarea ADN-ului şi în reacţiile de epoxidare a olefinelor catalizate de compuşii de coordinare BLM-Fer şi BLM-Mangan.

Bleomicina a servit ca model pentru sinteza chimică a nucleazelor, care cuprind o parte chelatantă şi o parte responsabilă de afinitate pentru ADN, capabilă să recunoască într-un anumit caz, foarte selectiv, secvenţele unui acid nucleic.

5. Complexul EDTA-Fe este un agent de afinitate şi este utilizat ca un instrument de lucru în biologia moleculară. Grupul de cercetare al lui Dervan a realizat sinteza unor molecule hibride, ansamblând printr-o legătură covalentă entitatea Fe-EDTA (= complex al ferului cu acidul 2,2', 2'', 2'''-(etilendiamino) tetraacetic) la diferite molecule care pot interacţiona cu ADN-ul (figurile IX.9 şi IX.14):

— un intercalant derivat din metidium (MPE-Fe);
— agenţi de recunoaştere a canalului mic (distamicină, neotropsină);
— sau oligonucleotide.



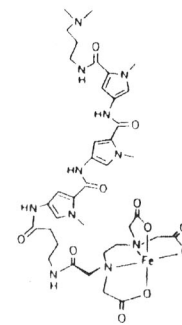


Figura IX.9. Structura complecşilor metidiumpropil-Fe(II) şi distamicină-Fe(II).

S-a văzut că aceşti derivaţi ai Fe-EDTA sunt excelente instrumente de lucru în biologia moleculară, dar nu pot fi utilizaţi ca agenţi terapeutici, pentru că activitatea lor de nucleobază este legată de capacitatea mare de a produce radicali hidroxil, care la rândul lor reprezintă forma redusă a oxigenului molecular, foarte toxic pentru celula vie.

În organismele care trăiesc în mediu aerob, concentrația anionului superoxid $O_2^{\bullet-}$ și a apei oxigenate este controlată de două metaloenzime: *superoxiddismutaza* (SOD) și *catalaza*. SOD catalizează dismutarea anionului superoxid în oxigen molecular și apă oxigenată, iar catalaza pe aceea a apei oxigenate în oxigen molecular și apă. Cele două enzime sunt indispensabile pentru un control riguros al speciilor reduse ale oxigenului molecular în vivo (figura IX.10).

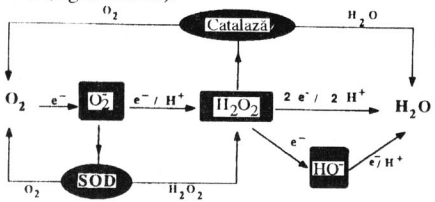


Figura IX.10 Reglarea concentrației in vivo a anionului superoxid și a apei oxigenate în cele două metalo-enzime: superoxiddismutază și catalază.

Radicalul hidroxil se formează prin reducerea H_2O_2 cu un electron și reacționează cu viteză limitată numai prin difuzie asupra macromoleculelor biologice, acumulându-se în nucleul aromatic, sau prin extragerea atomilor de hidrogen. Toate moleculele hibride preparate, plecând de la compusul de coordinare Fe-EDTA, s-au dovedit a fi instrumente remarcabile în biologia moleculară. Este cazul derivatului methidium-propil-Fe-EDTA (MPE-Fe), unul din cei mai buni agenți de scindare, cu DN-aza I, pentru studiul amprentei unei proteine sau a unei molecule mici, pe ADN. Partea de methidium din MPE-Fe, nu conferă compusului coordinativ specificitatea secvențială (pentru secvența studiată). Toată partea din ADN neprotejată de proteină, este expusă scindărilor cu sistemul MPE-Fe/reducător/O_2.

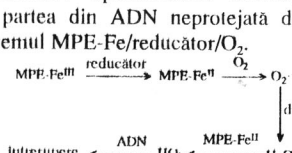


Figura IX.11. Schema metodei de amprentă ADN-proteine, cu MPE-Fe.
Reducător = dithiothreitol, $HSCH_2CH(OH)CH(OH)CH_2SH$.

Complexul MPE-FE produce scindări ale lanțurilor simple din ADN, eliminând o bază și eliberând extremitățile 3' și 5' - fosfat și în mod egal, terminațiile 3' - fosfoglicolat (figura IX.12)

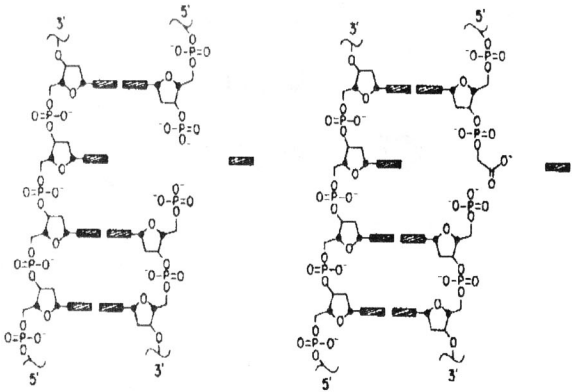


Figura IX.12. Degradarea ADN-ului prin intermediul complexului MPE-Fe(II): eliberarea bazei libere și formarea de două extremități 5' și 3' fosfat (schema din stânga) sau o extremitate 5' - fosfat și 3' - fosfoglicolat (schema din dreapta).

IX.2.1. Separarea ADN lanț dublu, cu formarea unei elice triple, prin intermediul unui complex „oligonucleotidă-Fe-EDTA"

Scidarea selectivă a unui ADN lanț dublu, cu ajutorul enzimelor de restricție, stă la baza dezvoltării caracterului genetic. În cazul complexului Fe-EDTA, este necesară legarea acestei nucleaze chimice de o proteină capabilă să recunoască o secvență de ADN, sau de un oligonucleotid, care prezintă o secvență formată numai din pirimidine (C sau T). Aceste baze heterociclice pot interacționa, prin legăturile de hidrogen formate în canalul mare, cu bazele purinice dintr-o secvență a ADN lanț dublu. Aceste legături de hidrogen (tip Hoogsteen) se formează la pH = 7 în cazul T, și la pH < 6,2 pentru C (figura IX.13).

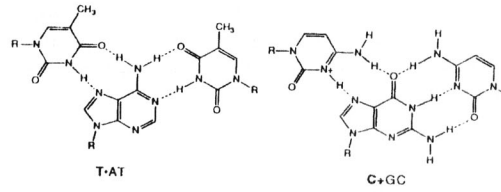


Figura IX.13. Formarea de tripleți ai bazelor heterociclice cu azot, prin asociere, în canalul mare, de T cu AT (T^* AT) și C^+ cu GC (C^+GC).

Cu un oligonucleotid alcătuit din 20 de pirimidine ca 5'-$T^*TCT_4CT_2CT_3CT_4T^*$-3', ce posedă pe cele două timine terminale (T^*) o entitate Fe-EDTA, este posibilă scindarea specifică de o parte și de alta a centrului de formare a elicei triple, într-un singur punct, al cromozomului III (340000 perechi de baze) al levurei (drojdiei) din *Saccharomyces cerevisiae* (figura IX.14c).

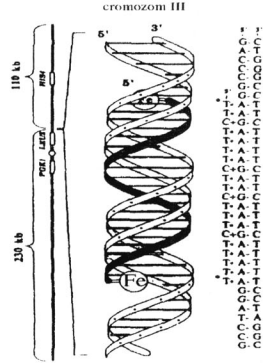


Figura IX.14. Utilizarea unei molecule „EDTA-Fe-oligonucleotid-Fe-EDTA", capabilă să formeze o elice triplă într-un punct unic al cromozomului III din *Saccharomyces cerevisiae*.

Această strategie, a elicei triple cu un oligonucleotid-agent de separare este mai indicată pentru degradarea ireversibilă a ADN-ului unui virus integrat în ADN-ul lanț dublu al celulei infectate.

Înainte de a aborda activitatea de nuclează a metaloporfirinelor cationice, putem menţiona rezultatele cercetărilor lui Sigman asupra scindărilor moleculelor de ADN prin intermediul compusului coordinativ bis(o-fenantrolină)Cu(I), în prezenţă de apă oxigenată sau de oxigen molecular şi un reducător (figura IX.15).

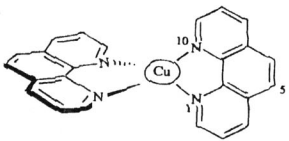


Figura IX.15. Structura compusului coordinativ bis(o-fenantrolină)Cu(I).

Unul din liganzii fenatrolinici se intercalează între perechile de baze şi separările sunt provocate prin hidroxilarea legăturii carbon-hidrogen din poziţia anomerică a dezoxiribozelor.

De asemenea mai trebuie menţionată utilizarea compuşilor de coordinare, uneori chirali ai Co sau Ru, ca sonde chimice pentru studiul conformaţiilor particulare ale ADN-ului (forma de elice, structura în cruce). O activare fotochimică a acestor compuşi de coordinare conduce la separarea lanţurilor ADN-ului.

6 Porfirinele cationice prezintă o afinitate importantă pentru ADN sau ARN. Cele mai noi studii s-au realizat cu mezo-tetrakis (4-N-metil-piridiniumil)porfirină, H_2-TMPyP şi derivaţii săi metalaţi (Mn, Fe, Zn, Ni) (figura IX.16).

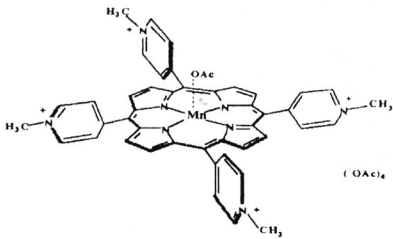


Figura IX.16. Structura mezo-tetrakis (4-N-metilpiridiniumil) porfirinato-mangan (III).

Au fost puse în evidență două moduri de interacțiune:

— intercalarea porfirinei libere între perechile de baze G-C și

— intercalarea la exteriorul elicei duble a AND-ului, în particular pentru derivații metalați ai TMPyP care au un ligand axial.

Vom prezenta în primul rând activitatea de nuclează a derivaților ferului și Mn din mezo-tetrakis(4-N-metilpiridiniumil) porfirină: Fe(III)TMPyP și Mn(III)TMPyP. Trebuie menționat însă că, ADN-ul poate fi degradat atât prin iradiere în prezența pofirinei libere cât și în prezența derivatului corespunzător cu Zn.

Eficacitatea separării lanțurilor ADN-ului în acest caz se corelează, cu randamentul cuantic de formare a oxigenului singlet, observat după activarea fotochimică a H_2TMPyP și Zn-TMPyP (randamentul cuantic Φ este 0.74 și respectiv 0.88 pentru acești doi derivați porfirinici).

Cu derivații Fe-TMPyP și MnTMPyP, separările lanțurilor ADN-ului sunt datorate unei oxidări chimice. Separările lanțurilor simple se produc prin două mecanisme diferite. Compusul pe bază de fer este eficace ca agent de separare deoarece este activat de un reducător (ditiotreitol) în prezența oxigenului molecular. Ca și în cazul compușilor de coordinare Fe-EDTA, speciile responsabile de activitatea nucleazei sunt radicalii *hidroxil* formați pe calea activării reducătoare a dioxigenului. Practic se observă o diferență importantă între compușii de coordinare Fe-EDTA și Fe-TMPyP:

— primul compus nu are afinitate pentru ADN și activarea se face la limita zonei Stern, la 5-10 Å de la elicea dublă, fapt care conduce la o difuzie puternica a radicalilor hidroxil, o eficacitate redusă și un randament de separare de 10-20%;

— derivatul pofirinic Fe-TMPyP prezintă o afinitate importantă pentru ADN. Activarea sa se realizează deci la contactul cu ținta, ceea ce limitează difuzia radicalilor hidroxil (figura IX.17).

Pe lângă aceste metode, este posibilă utilizarea donorilor de atomi de oxigen hidrosolubili, la pH = 7, ca monopersulfatul de potasiu.

Deși până în prezent nici o entitate TMPyP-Mn(V)=O n-a putut fi izolată și caracterizată, datele experimentale asupra separării lanțurilor ADN-ului sugerează că complexul porfirinic activ este capabil să hidrolizeze legăturile carbon-hidrogen din dezoxiriboză. Separarea lanțirilor de ADN se realizează foarte selectiv într-un singur loc și nu pare a se datora unei specii capabile să difuzeze.

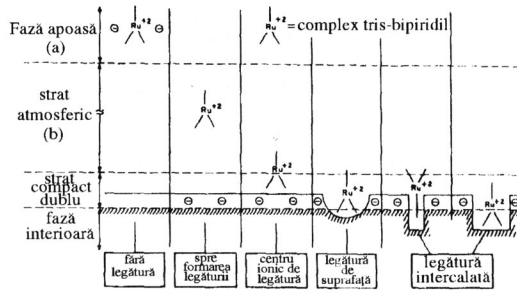


Figura IX.17. Zonele de interacțiune între un complex metalic (cazul Ru) și o suprafață anionică (ADN): a = regiunea Debye-Hückel; b = regiunea Goui-Chapman și c = regiunea Stern.

Utilizarea ADN-ului plasmidelor (ΦX 174 sau pBR 322) permite punerea în evidență a separării lanțurilor simple prin intermediul unei nucleaze chimice, la un ADN cu lanț dublu (figurile IX.18 și IX.19).

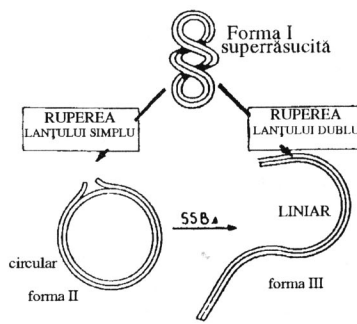


Figura IX.18. Trecerea unei forme superrăsucite I a unui ADN plasmidic, cu lanț dublu, la forma circulară relaxată II, ca urmare a unei rupturi a lanțului simplu și la forma liniară III prin acumulare de ruperi a lanțurilor simple.

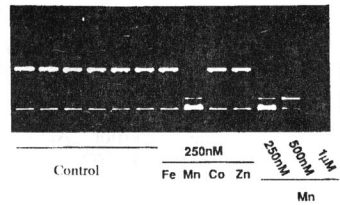


Figura IX.19. Exemplu de ruperi ale ADN de ΦX 174 prin endonuclează chimică Mn-TMPyP/$KHSO_5$.

Compusul de coordinație MnTMPyP (raportul complex/ADN fiind 250 nm/17,5 μM pb, aproximativ o porfirină cu mangan pentru 142 perechi de baze) rupe ADN ΦX 174 în mai puțin de un minut, în prezență de monopersulfat de potasiu. Forma liniară III nu apare după dispariția completă a formei superrăsucite, ceea ce indică că această nuclează chimică produce o rupere a lanțurilor simple. Activitatea acestor porfirine cationice cu Mn, este observată la concentrații foarte mici: 0,5 - 10 nM. Fiecare moleculă de MnTMPyP poate crea 4-8 ruperi asupra lanțului dublu al ADN-ului. La aceeași concentrație, compușii cu fer, cobalt sau zinc ai acestei porfirine, nu au activitate de nucleaze. Aceasta confirmă că activitatea de nucleză se datorează unei specii active, legată de natura ionului metalic central din complex.

Mai multe argumente sugerează că această specie activă poate fi o entitate metal-oxo cu grad înalt de oxidare (figura IX.20).

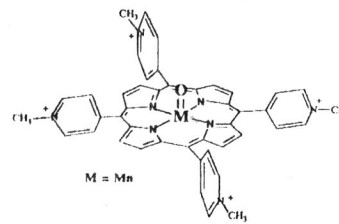


Figura IX.20. Reprezentarea schematică a speciei active metal-oxo a nucleazei chimice MnTMPyP/$KHSO_5$.

— scindările nu sunt observate decât atunci când metaloporfirina este activata de un donor de atomi de oxigen şi mecanismul de rupere implica smulgerea unui atom de hidrogen din poziţiile 5' sau 1' (mecanism apropiat celui de hidroxilare a legăturilor C-H, catalizate de citocromul P-450 sau de metaloporfirine sintetice).

IX.2.2. Aspecte moleculare ale ruperilor ADN prin intermediul $MnTMPyP/KHSO_5$

Date precise asupra acestui mecanism de rupere pot fi obţinute asociind următoarele rezultate:

— identificarea produşilor de degradare a dezoxiribozelor;

— caracterizarea locurilor unde are loc procesul de rupere;

— relaţiile între natura secvenţei şi activitatea de nucleazâ a porfirinelor cu mangan.

Identificarea bazelor libere şi a doi produşi majoritari de degradare a dezoxiribozelor din ADN lanţ dublu, prin intermediul $MnTMPyP/KHSO_5$, furfural şi 5-metilen-2furanona, indică faptul că principalele ţinte a acestei nucleaze chimice sunt cele două legături C-H în 5' şi 1' din zaharuri (figura IX.21).

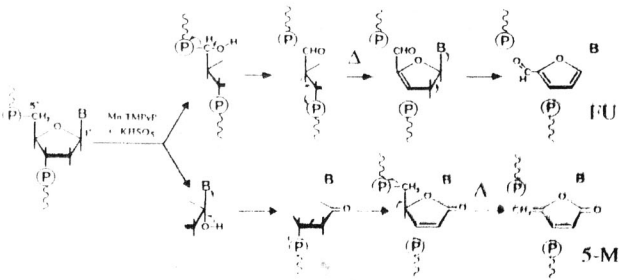


Figura IX.21. Activarea legăturii C-H în 5' sau 1' a dezoxiribozelor ADN prin nucleaza chimica $Mn\ TMPyP/KHSO_5$. Formarea a doi produşi de degradare: furfural (FU) şi 5-metilen -2- furanona (5-MF), B = bază.

În ambele cazuri, după etapa de încălzire, cele două extremități create prin oxidarea dezoxiribozei, sunt fosfomonoesteri ($ROPO_3^{--}$). Liganzii, având nevoie de extremitățile 5'-P și 3'-OH, nu pot fi utilizați direct pentru relegarea ADN-ului rupt prin intermediul acestei nucleaze chimice.

Un studiu amănunțit cu ajutorul oligonucleotidelor scurte, permite confirmarea relației dintre mecanismul de rupere și punctele de afinitate ale metaloporfirinei. În cazul tripleților A•T, punctele de mare afinitate ale Mn-TMPyP, hidroxilarea are loc foarte selectiv pe carbonul 5' al zaharidului din apropierea 3', de o parte și de alta a tripletului A•T. Aceasta conduce la un decalaj de patru perechi de baze heterociclice între cele două rupturi pe fiecare lanț (decalajul se face pe 3', ceea ce marchează interacțiunea metaloporfirinei în „canalul mic"; în cazul unei interacțiuni în „canalul mare", decalajul se va face către 5') (figura IX.22).

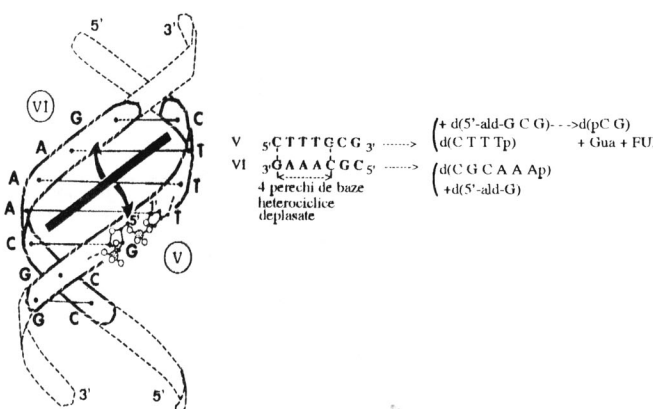
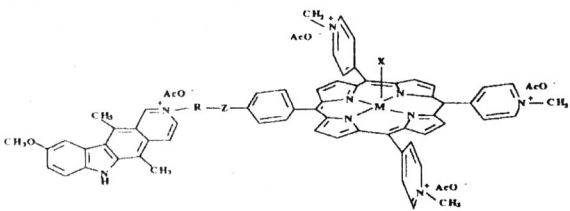


Figura IX.22. Hidroxilarea preferențială a Mn-TMPyP/$KHSO_5$ pe carbonul 5' al zaharidului situat în poziția 3' a unui triplet A•T. Decalaj de patru perechi de baze heterociclice cu azot, rezultate din interacțiunea metaloporfirinei în „micul canal".

IX.2.3.Activităţi biologice ale moleculelor „hibride"porfirină cationică cu vector, mangan
(vector = intercalant sau oligonucleotid)

Vectorizarea Mn-TMPyP-ului cu ajutorul unui intercalant (în cazul de faţă 9-metoxielipticina legată în poziţia para de un radical fenil al ligandului porfirină), conduce la molecule citotoxice, având activitate asupra celulelor tumorale, echivalentă cu aceea a bleomicinei. Molecula hibridă cu M = Mn din figura IX.23., are o afinitate foarte mare pentru ADN ($K_{afinitate} = 10^8$-10^9 M^{-1}) şi o acţiune toxică asupra celulelor leucemice de 0,8 μM (valoare care corespunde la un grad de inhibare de 50% a creşterii celulare în 48 de ore, CI_{50}).



număr de legături	R	Z	M	X	ID_{50} (μM)
7	$-(CH_2)_4-$	-CONH-	Mn^{III} Fe^{III} Zn^{II}	AcO AcO —	0.8 ± 0.2 1.6 nesemnificativ
8	$-(CH_2)_5-$	-CONH-	Mn^{III}	AcO	1.4
12	$-(CH_2)_4CONH(CH_2)_3-$				1.0
13	$-(CH_2)_5CONH(CH_2)_3-$				1.2
11	$-(CH_2)_4CONH(CH_2)_3-$	-O-	Mn^{III}	AcO	0.8
12	$-(CH_2)_5CONH(CH_2)_3-$				1.1

Figura IX.23. Structura unei molecule hibride „porfirină Mn-intercalant". R = $-(CH_2)_4-$; Z = -CO-NH-; X = acetat.

Pentru bleomicină, aceeaşi valoare este 1,6 μM. Citotoxicitatea moleculelor hibride depinde în principal de ionul metalic central. Înlocuirea Mn cu Fe, conduce la un produs mai puţin activ (CI_{50} = 1,8 μM) sau chiar total inactiv în cazul nichelului. *Legarea unui oligonucleotid la o*

nucleaza chimică, permite ţintirea activităţii de rupere pe o secvenţa particulara a unui ADN sau ARN lanţ simplu (strategie „antisens") sau a unui lanţ dublu din ADN (strategie „triplă elice"). În prezent, în literatura de specialitate se discută perspectivele terapeutice ale oligonucleotidelor antisens în cazul SIDEI şi CANCERULUI. În aceste două cazuri, activitatea farmacologică este legată de capacitatea de a inhiba manifestarea genetică a virusului sau a oncogenului, fie la nivelul transcrierii (ADN) sau la nivelul traducerii (ARN) (figura IX.24).

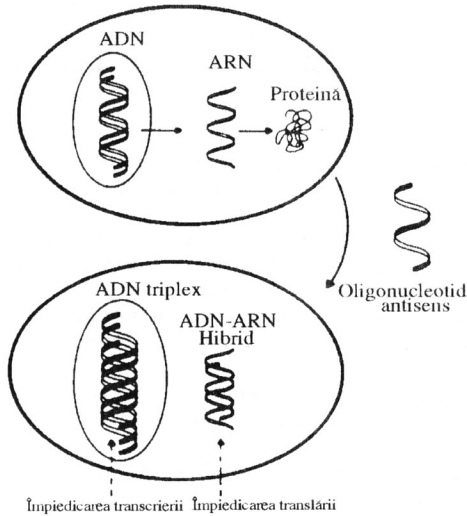


Figura IX.24. Acţiuni posibile ale oligonucleotidelor anti-sens, la nivelul ADN (stoparea transcrierii) sau ARN (stoparea traducerii).

Molecula hibridă „tris-metilpiridiniumil-porfinato-mangan(III)-oligodezoxiribonucleotidă" din figura IX.25., sau vectorul, este al 19 mer complementar din zona celor 8 coduri iniţiale ale genei TAT din VIH (TAT = factor de activare a transcrierii ADN-ului viral).

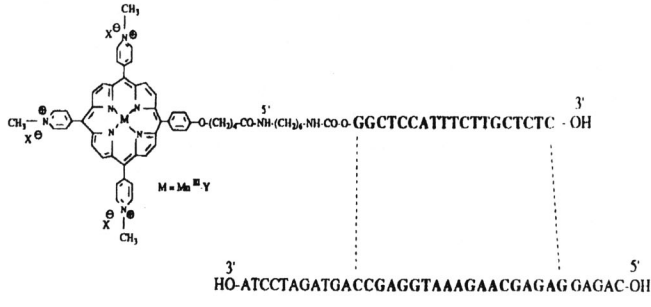


Figura IX.25. Structura unei molecule hibride „tris-metilpiridiniumil-porfinato-mangan(III)-oligonucleotidă", ţintă legată pe zona ce conţine codul de iniţiere a genei TAT din VIH-1 (zona 5360-5394, după numerotarea lui Wain-Hobson şi colaboratorii).

Activitatea de nuclează a acestei porfirine cu mangan legată la un vector oligonucleotidic, este detectabilă la concentraţii mici (5-10 nM) pentru un raport mic agent de rupere/ţintă (3:1).

Pătrunderea redusă a acestor oligonucleotide „anti-sens" în celulele ţintă, este un factor de limitare în dezvoltarea acestor molecule ca agenţi terapeutici.

Activarea selectivă a legăturilor C-H din dezoxiribozele ADN-ului, nu este o particularitate chimică a câtorva complecşi ai metalelor tranziţionale.

Natura a selecţionat nu numai BLM, ci şi alţi produşi naturali ca: neocarzinostatina, calicheamicina, dinemicina şi esperamicina (figura IX.26).

Aceste antibiotice antitumorale au în comun acelaşi mecanism de acţiune: centrul nedienic ("motif enediyne"), prin adiţia unui nucleofil, suferă o rearanjare în biradical aromatic (după un proces descris de Bergman în anul 1972 şi prezentat în figura IX.27).

Această entitate formată în „micul canal" al ADN-ului, este capabilă să smulgă un atom de hidrogen din poziţiile 1', 4' sau 5' din dezoxiriboze conform secvenţei ADN-ului şi structura antibioticului.

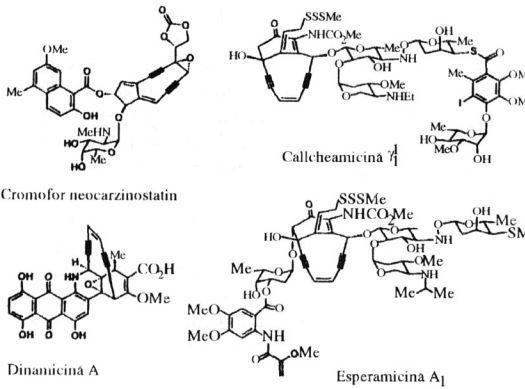


Figura IX.26. Structura antibioticelor antitumorale având „motif enediyne", ce poate conduce la radicali aromatici, prin rearanjare Bergman.

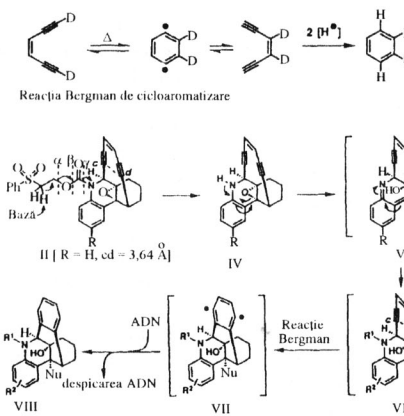


Figura IX.27. Reacția de cicloaromatizare a lui Bergman; mecanismul de acțiune a moleculelor nedienice citotoxice capabile să rupă ADN-ul prin deplasarea atomului de H din dezoxiriboză.

IX.3. Compuşii coordinativi şi acizii nucleici

Activitatea de reglare a multor ioni necomplexaţi, la nivelul acizilor nucleici, este deosebit de importantă în cadrul funcţiilor celulei. În continuare se vor aborda aspecte referitoare la legarea biocationilor direct de ADN sau de proteinele ce leagă ADN-ul. Se pare că există o reţea complexă de comunicare pe bază de interacţii „feed-back" în citoplasma celulei, care implică cel puţin următorii ioni: K^+, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} şi Cu^+. Recent s-a clarificat faptul că există o relaţie strânsă între concentraţiile biocationilor din celulă şi procesul de transcriere/translare a genelor.

Dovezile s-au acumulat atât de pe urma observaţiilor directe ale activităţilor celulare reglate de ionii metalici şi nemetalici cât şi din analiza proteinelor ce leagă AND-ul şi ARN-ul. În continuare se va dezvolta ideea, ce susţine existenţa mecanismelor „feed-back" intrinseci, ce au loc între diferitele niveluri ale proteinelor din celule şi concentraţiile principalelor 20 de elemente, multe din ele sub forma unor ioni simpli.

IX.3.1. Principii de bază

Biocationii pot interacţiona cu acizii nucleici la diferite niveluri. Cel mai simplu mod de interacţiune este *coordinarea directă* a ionului metalic de secvenţa de acid nucleic formând un compus de coordinare, conform tabelului IX.2.

Eichorn, s-a preocupat în mod particular de acest aspect nu atât din punctul de vedere al mecanismului de control, cât pentru a înţelege de exemplu aspectele legate de sinteza şi toxicitatea unor forme de ADN. Un al doilea tip de interacţii este dat de legarea între prima sferă de coordinare a unui complex metalic cu moleculă mică şi secvenţa de acid nucleic, formând a doua sferă de coordinare. Cercetările lui Norden, Sigman şi Barton, au adus contribuţii importante în elucidarea acestor aspecte (tabelul IX.3).

A treia posibilitate de coordinare a biocationilor din tabelul IX.2 este aceea a legării unui metal de un centru activ situat la distanţă, pe o proteină ce leagă acizii nucleici,. Se vor discuta în continuare aceste trei posibilităţi. Nu trebuie uitat faptul că în istoria vieţii pe Pământ, au existat ioni metalici în soluţie înaintea sintezei acizilor nucleici, deci aceşti biopolimeri au luat naştere inevitabil într-un mediu anorganic ! Astfel, chimia compuşilor de coordinaţie ai ADN-ului cu ionii anorganici, a avut

în parte un *caracter inevitabil*, la fel ca și predecesorii săi în cursul evoluției.

Tabel IX.2. Efectele asocierii ionilor metalici cu secvențe de acizi nucleici.

Ionul metalic	Efectul
Na^+, K^+	Participă la o stabilizare polielectrolitică cu o coordinare directă slabă.
Mg^{2+}	Are loc o coordinare directă de tip general cu grupările fosfat din poziții speciale ale acidului nucleic. Probabil controlează un domeniu larg de reacții.
Fe^{2+} (Mn^{2+})	Coordinază inițial la proteinele cu activitate de reglare iar ulterior și la FUR și IRE. Participă și la controlul reacțiilor redox și procesele energetice.
Cu^+	Coordinează la câteva proteine cu activitate de reglare, incluzând și ACE.
Zn^{2+}	Coordinează în general la multe proteine cu activitate de reglare, care conțin zinc. Participă la controlul mai multor produși metabolici, printre care, sterolii și unii hormoni, rezultați din metabolismul secundar.
H^+	Valoarea pK_a a bazelor azotate și a diesterilor fosforici ai ADN-ului asigură un efect limitat al H^+, la pH=7, dar trebuie luată în considerare implicarea în acțiunea metaloproteinelor și fosfoproteinelor regulatoare ce sunt dependente de pH.

Se poate afirma că nici un *mesaj genetic* sub formă de secvențe de acizi nucleici nu ar fi putut fi transmis și păstrat, fără o comunicare cel puțin cu valoarea funcțională a primilor trei ioni metalici din tabelul IX.2, de vreme ce acidul nucleic este un polianion și trebuie să posede în sistem cationi pentru neutralizarea sarcinilor. Aceste interacțiuni cu caracter general au condus în final la o specificitate locală. Concentrațiile ionilor metalici și pH-ul din celulă sunt factori hotărâtori ai constantelor de stabilitate efective ale proceselor de cuplare cu liganzi organici,

presupunând, ca în cazul de față, descriem un studiu în soluție apoasă. Protonul este în fapt un ion regulator de tip „metal" foarte simplu.

Tabel IX.3. Interacțiile compușilor de coordinație cu moleculă mică ai biocationilor cu secvențe de acizi nucleici.

Complexul metalic	Efectul
Compuși de coordinație redox activi, care conțin de exemplu: Fe, Cu, Mn, Ru, Os	Oxidarea determină denaturarea acizilor nucleici prin intermediul radicalilor liberi.
Compuși de coordinație ai metalelor grele, cum ar fi de exemplu: Pt, Hg, Au	Legarea covalentă de bazele azotate determină denaturarea acizilor nucleici. Se folosesc în medicația antitumorală.
Compuși de coordinație ai metalelor ușoare, de exemplu: Be, Al	Posibilă atașare la radicalii fosfat ai acizilor nucleici. Pot fi periculoși din cauza toxicității.

Se presupune că pH-ul extracelular nu ar fi variat în cursul existenței vieții, timp de 3×10^9 ani și se consideră în continuare că acesta a fost și este cuprins în intervalul 7,0-8,0. Prin comparație, o serie de concentrații ale biocationilor au suferit modificări importante, chiar dacă acestea s-au petrecut de-a lungul unei perioade îndelungate, începând cu aproximativ un miliard de ani în urmă. Aceste modificări de disponibilitate s-au datorat trecerii de la soluțiile bogate în sulfuri, anaerobe, în funcție de condițiile existente în oceanul planetar original, la condițiile aerobe, ce au devenit stabile acum aproximativ 500-1000 milioane ani. Modificările concentrațiilor biocationilor de-a lungul unei asemenea perioade de timp au trebuit să corespundă produsului de solubilitate și echilibrului ionic complex, conform figurii IX.28 și tabelului IX.3. Numeroase alte elemente chimice nu au fost trecute în acest tabel. Având formată o imagine generală asupra mediului extracelular, trebuie să examinăm și mediul intracelular, de vreme ce ADN-ul și ARN-ul se află situați în citoplasma celulei deci în interior. De-a lungul perioadei de evoluție, citoplasma a rămas un mediu reducător, fiind mai apropiat de condițiile anaerobe din tabelul IX.4 decât de condițiile aerobe. pH-ul intern îl vom considera ca fiind întotdeauna situat la valoarea 7,0. Compușii de coordinație polinucleari ai sulfului cu metalele se formează în citoplasmă și cunoaștem

de asemenea că multe proteine şi alţi bioliganzi sunt purtători de grupări - SH libere.

Tabel IX.4. Concentraţiile disponibile ale ionilor liberi din citoplasmă.

Ionul metalic	Concentraţiile în condiţiile iniţiale (mol/l)	Concetraţiile în condiţii aerobe (mol/l)
Na^{+}	$>10^{-1}$	$>10^{-1}$
K^{+}	$\sim 10^{-2}$	$\sim 10^{-2}$
Mg^{2+}	$\sim 10^{-2}$	$\sim 10^{-2}$
Ca^{2+}	$\sim 10^{-3}$	$\sim 10^{-3}$
Mn^{2+}	$\sim 10^{-6}$	$\sim 10^{-6}$
Fe	$\sim 10^{-7}$ (Fe(II))	$\sim 10^{-17}$ (Fe(II))
Co^{2+}	scăzută	scăzută
Ni^{2+}	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$
Cu	$<10^{-20}$	$\sim 10^{-10}$ (Cu(II))
Zn^{2+}	$<10^{-12}$	$\sim 10^{-8}$
Mo	$\sim 10^{-9}$ (MoS_4^{2-})	10^{-8} (MoO_4^{2-})

Este foarte probabil ca procesul de menţinere a vieţii, pe baza secvenţelor de acizi nucleici, a depins în mod direct de întreţinere a acestei atmosfere reducătoare iniţiale, de vreme ce ADN-ul şi ARN-ul nu sunt stabili în prezenţa dioxigenului şi a ionilor metalici liberi.

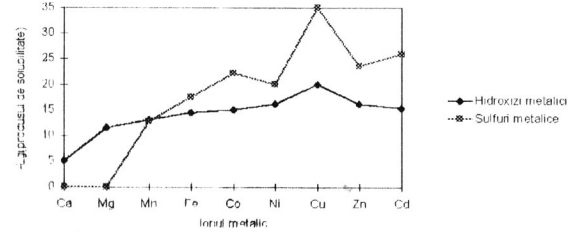


Figura IX.28. Produşii de solubilitate ai hidroxizilor şi sulfurilor metalelor divalente, care au avut o importanţă deosebită în evoluţie. Liniile orizontale indică un produs de solubilitate care dă un precipitat la pH=7 şi pentru $[M^{2+}]=10^{-4}$ M. Hidroxidul de Fe^{3+}, neindicat în figură, este extrem de insolubil la acest pH.

Când se vorbește despre procesul de evoluție, biologii se referă, în mod obișnuit, doar la acizii nucleici, dar de fapt, acești polimeri nu sunt viabili fără perpetuarea unui mediu protector, de exemplu în condițiile aproximativ similare celor din atmosfera originală de pe pământ. Aceasta necesită păstrarea mecanismului de replicare a ADN-ului sau a oricărui *polimer primitiv* purtător de informație sub formă de *coduri* sau *mesaje*. De asemenea, trebuiesc conservate condițiile chimice, în general instabile, ce depind de menținerea procesului de transformare al energiei. Este cazul când transformarea energiei luminoase sau a reactanților chimici externi, în cadrul sistemelor biologice, depinde în mod esențial de prezența ionilor metalici. Aceste condiții au trebuit să apară înaintea efectuării sintezei ADN-ului. Dat fiind faptul că astăzi, multe enzime implicate în mecanismele de protecție și control , se folosesc de ionii metalici, (catalazele, peroxidazele și superoxiddismutazele), cât și faptul că la sintezele biopolimerilor, incluzând aici și ADN-ul, din gazele atmosferei primare (CO, H_2, N_2, CH_4), este nevoie absolută de acești ioni metalici. Pentru transportul și vehicularea ionului fosfat, rezultă că nu era necesară doar menținerea unei atmosfere reducătoare stabile, prezența unor mecanisme complexe de transformare a energiei, ci și menținerea unui set adecvat de ioni metalici pentru toate tipurile de necesități biologice, conform figurii IX.29. Aceste comportări implică existența unei homeostazii intrinseci a mediului citoplasmatic intern.

În procesul evoluției apare problema mult dezbătută a „oului și găinii". În ultimul timp, cercetătorii în domeniul biologiei moleculare și-au canalizat studiile asupra acizilor nucleici, considerați a fi „găina", natura „oului" fiind dependentă de chimia ionilor anorganici complecși ce au evoluat de asemenea în sistemele vii, (figura IX.29).

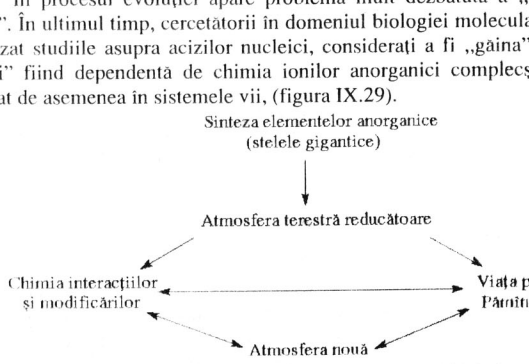


Figura IX.29. Evoluția interactivă a chimiei anorganice și biologice

Pentru a putea înțelege fenomenul evoluției, vom începe analiza cu ionii metalici ce nu sunt asociați unor procese redox sau reacțiilor cu participarea sulfului, de vreme ce unele dintre funcțiile acestora nu s-au modificat prea mult în timp. Vom arunca apoi o privire asupra elementelor prezente în „urme", în final luând în considerare interacțiunile ionilor metalici ce ar putea să nu facă parte din patrimoniul biologiei, dar ar putea fi valoroși din punct de vedere biomedical, ca medicamente sau agenți poluanți periculoși, conform (tabelului IX.2). În acest scop, ne vom folosi de chimia ionilor complecși, tratând fenomenele începând de la interacțiunile directe cu ADN-ul și până la interacțiunile de la distanță.

Nu trebuie uitate nemetalele. S-a menționat deja importanța protonului (H^+). De asemenea, există procese de reglare a carbonului ce poate proveni din dioxidul de carbon (CO_2) atmosferic, sub formă de ioni HCO_3^-, prin interacția $CO_2/H_2O/H^+$. În privința azotului (N) nu se cunoaște vreun mecanism de reglare; această posibilitate rezidă însă din concentrațiile amino-acizilor și bazelor azotate cu funcții specifice și din procesele de sinteză ale acestora. La fel în cazul sulfului (S) și seleniului (Se). Încă nu se știe sigur dacă ionul Cl acționează direct la nivelul ADN-ului, acesta poate fi menținut în celule la o concentrație scăzută, corelată cu concentrația ionului HCO_3^-, plasându-l astfel în balanța factorilor homeostatici.

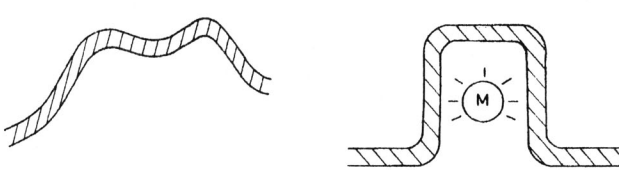
În final se va discuta și despre fosfor, care este dacă nu primul, cel puțin unul dintre elementele cu importante efecte de reglare, sub formă de ion fosfat, fie legat direct (și covalent) de unele proteine, fie intrând în structura unui fosfoglucid ciclic, cum este cazul c-AMP-ului. Trebuie să privim în mod constant ionul fosfat, ca un ion cu acțiune de reglare, de vreme ce acesta intervine permanent în controlul energetic prin intermediul pirofosfaților biologici, ca ATP-ul și datorită unei strânse legături cu concentrația ionilor de calciu. Faptul că ionul fosfat este legat covalent nu prezintă nici un interes real. Aceasta permite exercitarea unui control, mai degrabă cinetic decât termodinamic, asupra concentrațiilor sodiului și potasiului citoplasmatic.

IX.3.2. Acizii nucleici și ionii de Na^+, K^+, Mg^{2+} și Ca^{2+}

Există o caracteristică *curioasă* a implicării elementelor anorganice în biologie. Astfel, în vreme ce elemente cum ar fi sodiu, potasiu, magneziu și calciu sunt întotdeauna implicate puternic în procesele lumii

vii, la fel ca şi nemetalele hidrogen, carbon, azot, oxigen, siliciu, fosfor şi sulf şi împreună cu o serie de elemente tranziţionale de la mangan la zinc (prezente în urme), din aceste sisteme lipsesc cu desăvârşire elementele care aparţin grupelor 3, 4, 13, şi 14 din sistemul periodic, cum sunt aluminiu şi galiu, titan şi germaniu etc. Acest lucru simplifică discutarea interacţiilor cu ADN-ul, câtă vreme ionii de Na^+, K^+, Mg^{2+} şi Ca^{2+} se comportă destul de simplu, ca o clasă de ioni ce prezintă afinitate pentru secvenţele de ADN ce funcţionează ca bioliganzii cu atomi de O ca atomi donori, într-un schimb electrostatic relativ rapid, pe când celelalte elemente se leagă covalent într-o mare varietate de moduri.

Concentraţiile în ioni Na^+ şi K^+ asigură un echilibru electrolitic în interiorul celulei, servind drept contraioni importanţi ai ADN-ului şi ARN-ului (din care cauză trebuie scrişi sub forma ionică cu sarcină electrostatică). Interacţiunile sunt selective până la un anumit nivel, de vreme ce ADN-ul şi cromozomii îşi modifică conformaţia funcţie de conţinutul în NaCl şi respectiv KCl (concentraţiile citoplasmatice ale acestor ioni sunt de 100 mM K^+ şi 10 mM Na^+). Recent s-a evidenţiat un rol deosebit al acestor doi cationi, în special al potasiului. La capetele lanţurilor de ADN există structuri telomere ce constau probabil din bucle, formate din bazele guaninice. Aceste bucle sunt stabilizate de către cationii monovalenţi, cel mai probabil de ionii K^+ din celulă, figura IX.30.



(a) Lanţ neregulat de ADN, ARN sau proteină

(b) Stabilizarea structurii cavităţii ADN, ARN sau proteinei

Figura IX.30. Forma dezordonată a structurii telomere pentru ADN, favorizată de către absenţa cationilor, în special a ionilor de K^+ (a) şi structura ordonat pliată datorată efectului de stabilizare de către ion a unei cavităţi selective (b).

Structura este asemănătoare unei potcoave, pentru că EGTA se pliază în jurul ionului metalic, unde selectivitatea cationului este controlată prin faptul că bucla formată este incapabilă să se închidă complet.

Un alt exemplu tipic anorganic constă în precipitarea selectivă a ionului K^+ din soluții apoase, de către ionul de tetrafenilbor. Forțele de împachetare conduc la o stabilitate mare, deci, ionul K^+ poate fi legat de atomii de oxigen (O) incluși în structura bazelor heterociclice cu azot ale ADN-ului.

Funcțiile combinațiilor formate între ionul de Mg^{2+} și ARN sau ADN sunt complicate. O mare parte din Mg^{2+} este asociat foarte slab cu lanțurile dublu-elicoidale, atașat probabil la grupările fosfat. Oricum, ADN-ul și ARN-ul prezintă o varietate de structuri locale convolute și încrucișate, unde legarea ionului metalic se realizează destul de puternic și în mod diferit. Înainte de a analiza mai îndeaproape acest mecanism, trebuie să observăm faptul că în celulă, concentrația Mg^{2+} liber este de aproximativ 10^{-3} M (Mg^{2+} total este de 10^{-2} M), dar concentrația Ca^{2+} liber este doar de 10^{-7} M (Ca^{2+} total este de 10^{-3} M). Compușii de coordinație ai calciului cu ADN-ul nu sunt deloc comparabili cu cei ai magneziului. De fapt, s-ar putea considera că dezvoltarea acizilor nucleici în celule depinde de eliminarea inițială a calciului liber până la o concentrație internă de 10^{-7} M. Biocationii divalenți cu rază ionică mare au tendința de a precipita ADN-ul.

Interacțiunile Mg^{2+}/ADN sunt echilibrate în mod critic prin competiția cu poliaminele. Motivul acestui comportament nu este încă elucidat. Concentrațiile poliaminelor, de exemplu spermina, scad și cresc în cursul ciclului celular, fiind cunoscut faptul că aceasta determină implicit o întărire și o slăbire a legăturilor cu magneziul. Mai mult, conformația dublu-elicoidală a ADN-ului este diferită în funcție de legarea cu Mg^{2+} sau cu poliamine. Ionul de magneziu, este absolut necesar pentru procesele de transcriere a ARN_n, ARN-polimerazei, pentru ribozomi cât și pentru toate fazele de sinteză a biopolimerilor care utilizează energia eliberată din complexul trifosforic. În practică s-a căutat să se sintetizeze o serie de compuși ionici complecși care să biomimetizeze poliaminele, în ideea că aceștia ar putea fi utilizați drept medicamente. Un astfel de exemplu de ion complex este dat în fig IX.31.

Înainte de a părăsi această grupă de elemente, trebuie să luăm în considerare posibilitatea că un complex sau metaloproteină care conțin aceste elemente ar interacționa în mod indirect cu ADN-ul. Pentru cazul

ionilor de sodiu şi potasiu, nu se cunosc astfel de situaţii, în schimb magneziul ne duce cu gândul în primul rând la clorofile. Până acum nu se cunoaşte vreun mecanism de reglare, direct sau indirect, care să se manifeste prin intermediul proteinelor legate covalent de clorofile; acest lucru ne surprinde cunoscând faptul că, de exemplu, complexul hemului cu ferul are acţiune de reglare. Ne mai surprinde şi faptul că dintre proteinele de control a concentraţiei calciului din celulă (şi sunt foarte multe), puţine sau chiar nici una, au rol de reglare.

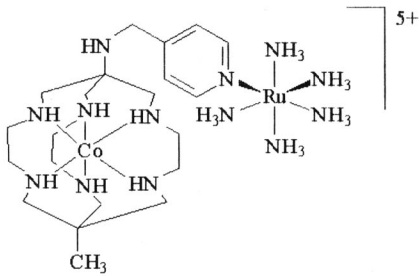


Figura IX.31. Un exemplu de medicament anorganic potenţial, studiat ca fiind un competitor cu poliaminele la legarea bioationilor de ADN.

O explicaţie pentru absenţa implicării directe a ionilor complecşi ai Mg^{2+} sau Ca^{2+}, sau chiar a activităţii de reglare a complecşilor metaloproteinici, ar fi aceea că nu au fost niciodată necesare ! Motivul constă în procesul vast şi bine cunoscut al reglării ADN-ului şi ARN-ului de către gruparea fosfat, ca în c-AMP sau prin fosforilarea proteinelor şi este strâns legat de concentraţiile ionilor Mg^{2+}, Ca^{2+} şi de asemenea de concentraţia H^+. Aceasta înseamnă că pentru toţi cei trei acizi biologici mai tari, în toate celulele există o reţea de comunicare între concentraţiile lor şi concentraţiile menţinute constante de toate formele de fosfat şi astfel compuşi simpli ai fosfaţilor realizează reglarea prin ei înşişi. Astfel, orice modificare a setului de parametri generali ai homeostaziei acido-bazice, (de exemplu odată cu pătrunderea calciului la scară mică în celulă), poate fi ajustată prin intermediul unor modificări consecutive ale compuşilor fosforici ai acizilor nucleici cât şi „expresiei" genelor. Se pot întâlni multe efecte biologice asociate cu modificările concentraţiei

calciului, (de exemplu efecte hormonale şi de nutriţie), dar trebuie să amintim aici şi natura celulei canceroase. Aceste modificări ale concentraţiei Ca^{2+} citoplasmatic diferă de modificările rapide ale concentraţiei calciului, de tip on/off, utilizate de către mecanismele de declanşare a contracţiei musculare sau cele de eliberare a hormonilor, când concentraţia Ca^{2+} revine la valoarea normală doar într-o sutime de secundă.

Modificările curente ale concentraţiei calciului mai pot fi generate şi prin denaturarea impulsurilor nervoase continue către muşchi, de exemplu prin lipsa utilizării musculaturii contractile rapide sau a contracţiilor rapide a muşchilor lenţi; ambele clase de muşchi îşi modifică treptat caracterul, probabil datorită în special, concentraţiilor staţionare modificate ale compuşilor de coordinaţie ai calciului (calmoduline) din celule dar, în final şi datorită modificărilor compuşilor pe bază de acid fosforic cât şi a proceselor de transcriere şi translare a genelor.

IX.3.3. ADN-ul şi ferul

O problemă neelucidată încă o constituie răspunsul la întrebarea dacă ferul şi sulfurile acestuia au avut vreo contribuţie în procesele de apariţie a vieţii, mult înainte de a fi fost sintetizată vreo moleculă de ADN. Răspunsul nu va putea fi dat după părearea noastră în viitorul apropiat! În acest caz, se presupune că viaţa a luat naştere prin reacţiile catalizate de către fer, prin intermediul compuşilor organometalici, la suprafaţa particulelor de sulfură. Acest lucru ne indică destul de evident o implicare a ferului în structurile primitive ale genelor bacteriilor, de exemplu a nitrogenazelor.

Dacă ferul are în acest caz un rol de reglare, atunci acesta este similar ferului (II) legat de resturile de cisteină din proteine, neexistând vreo implicare a Fe(II) sau a complecşilor mici ai ferului în structurile ADN-ului.

Până în momentul de faţă nu se ştie decât foarte puţin despre aceste sisteme de reglare, totuşi putem ilustra modul în care acestea funcţionează, referindu-ne la procesele de reglare a concentraţiei Fe(II) în bacteriile aerobe. Exemplul cel mai bine studiat este proteina de reglare ce conţine ionul Fe(III), numită FUR. De observat că, în realitate acesta este un proces de reglare a Fe(III) de către însuşi Fe(II), imediat la apariţia acestuia în mediu [Fe(III) rezultă prin oxidarea Fe(II)], deşi în celula vie nu se întâmplă astfel datorită menţinerii în interior a unui mediu reducător ce nu

favorizează procesul de oxidare. Mecanismul probabil al reglării concentrației Fe(II) este cel indicat în figura IX.32.

La echilibru, Fe(III) se leagă de proteina FUR. Aceasta din urmă se poate atașa unei porțiuni din ADN, numită cușca pentru fer, fie sub formă liberă necomplexată, fie complexată cu Fe(II). În cazul prezenței Fe(III), FUR declanșează în contact cu ADN-ul, sintezele proteice necesare pentru compușii responsabili de preluarea ferului (enzime ce sintetizează siderofori) iar pentru preluarea compușilor de coordinație siderofori ai ferului, procesele sunt sistate.

Când la ADN se leagă proteine FUR libere (fără fer), aceste sisteme sunt declanșate, în timp ce pierderea ferului (probabil din aconitază) întrerupe ciclul citrat și transmite metaboliții inițiali sintezei moleculelor necesare obținerii sideroforului. În paragraful următor vom reda o astfel de schemă generalizată.

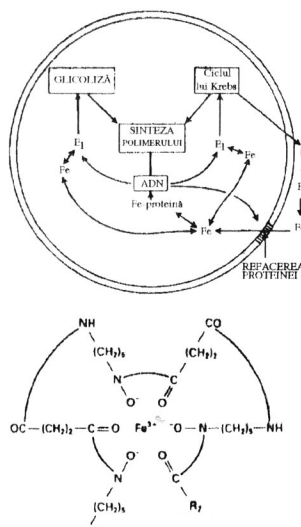


Figura IX.32. Reprezentarea schematică a metabolismului fetului în celulele bacteriilor. Se observă buclele de feed-back (E enzime, L feroxamine).

IX.3.4. Scheme generale de reglare cu metaloproteine

În procesul de reglare a concentrației elementelor esențiale, apare o conexiune între acizii nucleici de expresie a genelor enzimelor funcționale necesare, proteine și însuși ARN_m, ce se realizează prin intermediul disocierii ionilor metalici sau cofactorilor, M, în două direcții (tabelul IX.4) Într-o primă etapă, ADN-ul trebuie să sesizeze prezența ionului metalic liber, fie direct(ca în schema I figura IX.33, de exemplu Mg^{2+}), fie sub formă de metal legat de o proteină, (de exemplu Fe^{2+} sau Zn^{2+}, conform schemei II, figura IX.33). În timp ce ADN-ul sesizează concentrațiile ionului metalic, proteinele funcționale (enzimele) trebuie să echilibreze ionii liberi ai metalului, de vreme ce activitatea acestora trebuie controlată. În ansamblu sistemul are facilități suplimentare de „feed-back", pentru că valorile concentrațiilor în apoproteine ce coordinează metale, cofactori organici, sau ale ARN_m, pot fi diminuate prin activitate enzimatică, iar concentrația ionilor metalici poate fi corectată în plus sau în minus, prin sisteme de control a transportului ionic în interior și exterior, prin intermediul nivelului energetic al celulei.

Dacă un asemenea sistem complex ar trebui să funcționeze pentru un singur ion metalic, atunci acesta trebuie să comunice cu multe alte sisteme ale acțiunilor unor metale diferite, fiind necesar un nou mecanism „feed-back" intrinsec, astfel încât multe dintre funcțiile asociate diferiților biocationi trebuie să fie într-o relație directă printr-un mesager X care poate fi un al doilea metal, c-AMP sau altele. Se poate observa că fiecare bication esențial luat separat, aparține unui sistem de bucle de informație integrate, astfel că celula devine un *chemostat* ce conține mulți biocationi și bioanioni cum ar fi cei ai compușilor derivați de acid fosforic, cât și de pH. Acest „feed-back" intrinsec este esențial pentru operarea unui sistem de tip homeostatic. În momentul de față cercetătorii sunt angajați în explicarea mecanismului de acțiune a unor proteine care includ ioni metalici și care posedă acțiune de reglare. Până atunci însă trebuie să facem o serie de referiri asupra circuitelor de control intracelular, care au influențe particulare asupra circuitelor de control extracelular. Aceste circuite sunt dominate de purtătorii de ioni elementari, ca de exemplu cei ai Na^+, K^+, Cl^- și Ca^{2+}, de către hormoni cât și de o serie de molecule complexe care transmit informația biologică (tabelul IX.5).

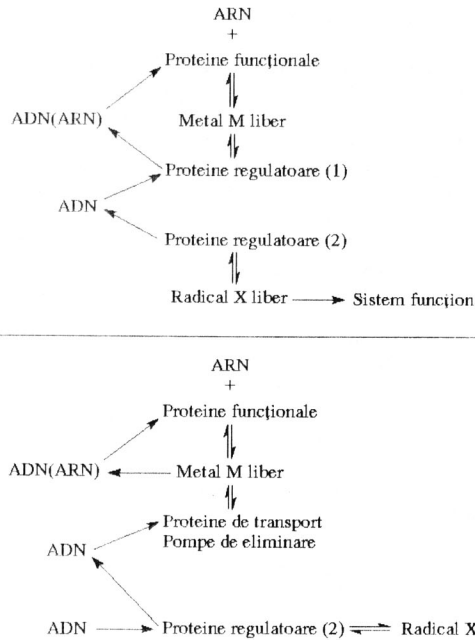


Figura IX.33. Două scheme ale interacțiunilor interactive între ADN-ul de expresie și ionii metalici. În schema de sus, sistemul de control se află în interiorul celulei. S-ar putea ca ionii de zinc să se comporte în acest mod. În schema de jos se prezintă un sistem legat de fenomenele de transport transmembranar intern și extern, în acest mod putând fi controlat ferul. X ar putea fi ionul fosfat.

Scara timpilor relativi de acțiune este: Na^+/K^+ - foarte rapid, Ca^{2+} și transmițătorii de ordinul milisecundelor, hormonii de ordinul orelor, zilelor sau chiar anilor. În celulă există scale de timp similare a diferitelor acțiuni, dar se crede că timpul de control al ionilor este diferit: Na^+/K^+ - foarte

rapid, fosfatul - secunde până la minute, hormonii şi metalele grele - ore până la săptămâni.

Tabelul IX.5. Exemple de metalo-proteine cu acţiune de reglare.

Proteina legată cu ADN-ul	Enzima sau proteina corespunzătoare
ACE I Cluster al ionului Cu(I)	Metalotioneină Cu, Zn Superoxiddismutaze Cu, Zn
FUR Fe(II)	Sistemul receptor TON B (Fe, Co) Enzime pentru sinteza Sideroforului Superoxiddismutaze Fe, Mn
IRE(ARN) Fe	Transferina Receptorul transferinei Feritina
Receptor Vitamina D Zn	Fosfataza alcalină (Zn) Calbindina (Ca) Osteocalcina (Ca)
Receptor Glucocorticoid Zn	Pompele de Na, K ?

IX.3.5. Cuplarea genelor (linkage)

Legate de procesele de reglare a concentraţiilor biocationilor prin intermediul FUR, există şi alte mecanisme de control cum ar fi cel al fer-superoxiddismutazei. (Se observă că aceeaşi proteină poate regla şi concentraţia de Mn(II) din organismele fotosintetizante, prin complexul Mn-FUR). Pe de altă parte, preluarea vitaminei B_{12} (Co(III)) pentru sinteza hemului este controlată cu ajutorul sistemului Ton B, reglat de către FUR, ce preia sideroforii formaţi.

Sistemul de cuplare prezentat mai sus este prezent la procariote. În organismele eucariote, preluarea ionilor de fer (posibil şi mangan) se face de către transferină (ce înlocuieşte sideroforul), necesitând un receptor de transferină (în locul sistemului Ton B). Proteina de reglare a complecşilor de captare şi receptare acţionează în acest caz asupra ARN_m prin intermediul proteinei de reglare a concentraţiei ferului (IRE), care, în mod curios, este asemănătoare *aconitazei.* Ionul Fe(II) este schimbat foarte rapid din IRE. Reglarea cu IRE se extinde şi asupra proteinei de stocare a ferului,

feritina. Încă o dată, se ajunge la concluzia că Fe(II) este cel ce reglează transportul, preluarea şi stocarea ionilor Fe(III). La eucariote necesitatea îndepărtării proteinelor cu Fe(II) din mecanismul de reglare a ADN-ului la cel al ARN_m, poate implica riscul mutaţiilor genetice.

Numărul al enzimelor şi altor proteine ce conţin Fe(II) liber disociabil este mare, ceea ce face ca acestea să fie bine interpătrunse cu activitatea genelor, asigurând astfel sursa de fer. Se poate constata formarea unui ţesut conector prin procese de hidroxilare a prolinei şi lisinei, cu sinteza hormonală şi toată gama de reacţii oxidative ale metabolismului secundar. Toate aceste căi metabolice sunt legate şi de compuşi coordinativi ai altor biocationi, pe care îi vom discuta în continuare.

Un alt exemplu de cuplare directă în interiorul structurii ADN-ului, este însăşi producerea de proteină FUR, dependentă de concentraţiile c-AMP -ului (figura IX.34), ATP-ului, Mg-ului; concentraţia ATP-ului este la originea bioenergeticii celulei, toate aceste dependenţe dau conexiunea între mai multe elemente. În acest caz gena de comutare aerob/anaerob ($\pm O_2$), *fnr*, este şi ea sensibilă la conţinutul în fer şi probabil şi la acţiunea c-AMP-ului. Homeostazia celulelor primitive poate fi menţinută cu ajutorul câtorva elemente, de exemplu, hidrogen, fosfor, fer. În celulele mai evoluate ferul este folosit pentru producerea multor hormoni ce acţionează la nivelul ADN-ului, dar aceşti hormoni acţionează asupra unui nou ion metalic, zincul. Vom discuta în continuare despre aceasta.

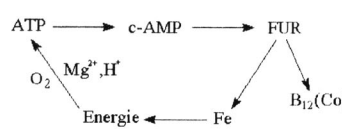


Figura IX.34. Cuplarea genelor ferului cu AMP ciclic.

IX.3.6. Zincul şi reglarea

Doar câţiva dintre biocationi pot acţiona ca factori de control (nu doar ca agenţi de reglare ai acizilor nucleici ci şi ca modulatori de acţiune) deoarece numai unii disociază suficient de rapid de proteine, (tabelul IX.6), şi totuşi să fie legaţi destul de puternic de macromoleculele biologice. Tabelul IX.2 împarte biocationii în grupe. Na^+ şi K^+ sunt în general

inefectivi în procesele de reglare pentru că aceştia nu se leagă chimic covalent. Mg^{2+} şi Ca^{2+} se comportă similar, cu timp de disociere cuprins între 10^{-3} şi 1 secundă, prezentând constante diferite de legătură. O caracteristică a acestor biocationi este aceea că se leagă relativ puternic doar de bioliganzii cu oxigenul ca atom donor. Ei sunt implicaţi direct în metabolismul hidrolitic acido-bazic, al ionilor fosfat şi în procesul lor de condensare, şi sunt foarte importanţi în mecanismele de control şi reglare, dar nu prin intermediul unui compus coordinativ format cu proteinele. Zincul (ca şi ferul) îşi manifestă acţiunea foarte diferit. Fiind inclus în structura unui compus de coordinaţie, coordinează centrii donori, care conţin sulf. În acest caz viteza de schimb este de minute sau ore şi nu de ordinul milisecundelor. Astfel zincul nu este decât un factor lent de control, putând compara efectele lui, cu efectele adrenalinei sau ale unui transmiţător (legat de calciu sau c-AMP) în milisecunde, cu timpii necesari legării unui hormon, asemănător unui sterol (legat de zinc). Cazul ionului fosfat este mai aparte, din cauză că acesta prezintă o varietate de timpi de acţiune, dependenţi de acţiunea enzimei specifice. Înainte de a examina mai în detaliu compuşii de coordinaţie ai zincului şi implicaţiile acestora în reglarea ADN-ului, trebuie să remarcăm că zincul, (ca şi cuprul), diferit de fer, nu putea fi disponibil rapid şi în cantităţi suficiente în mediile sulfuroase primitive (figura IX.28).

Tabel IX.6. Ionii ce acţionează ca factori de reglare şi control.

Ionul	Constanta de legare	Viteza de asociere	Viteza de disociere
H^+	$>10^7$	10^{11}	$<10^4$
Na^+, K^+	<10	10^9	10^8
Ca^+	10^6	10^9	10^3
Mg^{2+}	10^3	10^6	10^3
Zn^{2+}	10^{12}	10^8	10^{-4}
Mn^{2+}	10^{10}	10^9	10^{-1}
Fe^{2+}	10^{10}	10^9	10^{-1}
Ni^{2+}	10^{12}	10^5	10^{-7}
Cu^+	10^{13}	10^9	10^{-4}
Cu^{2+} (cluster)	10^{10}	10^8	10^{-2}
Cu^{2+} (enzime)	10^{15}	10^8	10^{-7}

Astfel întreaga concentrație a zincului depinde de dezvoltarea într-un mediu oxidant (în care trebuie să fie prezent O_2). Astăzi nu mai este nici un dubiu că reglarea concentrației zincului este o caracteristică importantă a eucariotelor aerobe, dar trebuie notat că este legată de prezența hormonilor care sunt un produs al metabolismului secundar, oxidativ și deci via fer și oxigen, de exemplu steroli, tiroină și acid retionic (tabel IX.7).

Vom comenta în continuare mai detaliat interacțiunile zincului cu acizii nucleici. Sub formă necomplexată concentrația zincului este controlată, la nivelul citoplasmei celulare, printr-un efect tampon al metalotioneinei. Sintetizarea acestei proteine, respectiv a zinc-metalotioneinei, poate fi stimulată destul de bine de către acest metal. Bucla „feed-back" a procesului de interacțiune care implică zincul poate fi extinsă relativ ușor și la alte cazuri.

Zincul este necesar pentru sinteza fosfatazei alcaline, dar această sinteză este controlată și de prezența vitaminei D, un sterol, prin intermediul proteinelor de tip „zinc finger" (amprentă de zinc). În această etapă, sinteza vitaminei D necesită hidroxilarea cu ajutorul proteinelor hemului (Fe), dar sinteza hemului necesită prezența levulin-dehidratazei, o enzimă cu zinc.

Tabel IX.7. Modelul propus pentru dezvoltarea celulară.

Viața primordială ↓ Genele originale ↓ ARN Co, Fe↓ ADN	Atmosfera reducătoare ↓ Eliminarea calciului, sodiului și clorului ↓ Reglarea H^+, Mg^{2+}, PO_4^{3-} și Fe ↓ Atmosfera oxidantă Protejare la oxidare Implicarea reglării Cu, Zn și a homonilor (Fe)

În general hormonii sterolici și cei similari hidroxilați sunt sintetizați de către enzime ce conțin fer, iar hormonii reglează biosintezele prin intermediul enzimelor cu zinc ("zinc fingers") astfel încât, la organismele eucariote, acești doi ioni, Fe^{2+} și Zn^{2+}, formează o rețea

conectivă foarte puternică. În realitate, această rețea se extinde și asupra ionilor de calciu și ionilor fosfat, după cum s-a menționat anterior, de exemplu, prin intermediul proceselor de control al proteinelor transportoare de calciu și a fosfatazei alcaline, de către vitamina D, după cum se observă în figura IX.35. Pe scurt, se realizează un cuplaj, în sprijinul procesului de stabilizare a țesutului conectiv, ce ne conduce la considerarea mai departe a formării acestui țesut conectiv; pe măsură ce realizăm acest lucru, observăm că legarea ionilor fosfat este controlată de pH, toate constantele de stabilitate la pH=7, fiind constante efective. Reglarea concentrației ionului metalic prin intermediul proteinelor constituie în același timp și o reglare a concentrației ionului H^+. Dacă interpretăm corect, există o interdependență a concentrațiilor citoplasmatice a metalului și anionilor din celula, ce conduce în final la un mecanism fin de reglare homeostatică sau chemostatică. În prezent nu se cunosc limitele acestei reglări. Un exemplu interesant în care zincul trebuie să fie legat de un alt element, care a devenit disponibil abia odată cu activarea moleculei de oxigen, este cuprul(I).

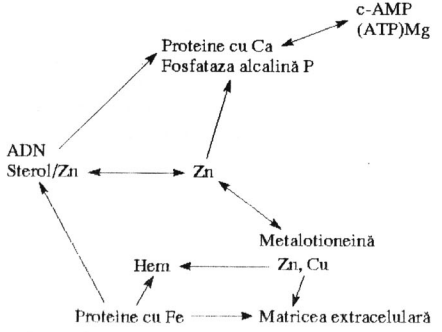


Figura IX.35. O schemă ciclică ce ilustrează cum o întreagă serie de biocationi și ionul fosfat pot fi legați între ei în cadrul mecanismului de homeostazie celulară. Factorii de control acționează prin intermediul enzimelor pentru sinteza sau degradarea enzimatică a hemului. În acest proces complex sunt implicate schimbările de energeie și ATP-ul.

IX.3.7. Reglarea concentrației cuprului

Cele două proteine citoplasmatice cunoscute sunt Cu- și Zn-superoxiddismutazele (SOD-Zn,Cu) și metalotioneina. Ambele proteine

au acțiune de reglare asupra proteinei ce leagă ADN-ul, numită ACE-1. Aceasta, ca și metalotioneina, este o proteină tip cluster a Cu(I) și poate avea un potențial redox foarte ridicat, astfel încât nu este influențată de prezența oxigenului. Clusterii de Cu(I) sunt capabili să acționeze așa încât concentrațiile ionilor liberi de Cu(I) sunt foarte bine controlate în celulă și menținute la niveluri foarte scăzute. Schimbul poate avea loc în intervale de timp de ordinul minutelor sau orelor.

Cercetările efectuate sugerează că ionii de cupru în exces sunt eliminați în afara celulei. Astfel, odată expulzat, cuprul se leagă în exterior, formând singurele *oxidaze* observate în general în mediul extracelular. Aceste enzime, *Cu-oxidaze*, generează produșii finali ai matricei țesutului de legătură, lignina, chitina și colagenul, care sunt de fapt produși ai unor reacții de oxidare a radicalilor liberi. Este de remarcat că din perioadele ulterioare ale evoluției ferul a fost exclus din procesele de oxidare extracelulară, deoarece acesta a fost precipitat în prezența oxigenului (atmosferei oxidante). Ferul, rămâne totuși un element esențial în etapele de oxidare intracelulare.

Dezvoltarea sistemelor multicelulare depinde de procesele de sinteză a acestei matrici a țesuturilor de legătură (conective), într-o manieră sistematică, legată de însăși dezvoltarea celulei. Structura matricei țesutului este consolidată de către ionii de calciu sau de reticulările transversale. Observând atent procesele de sinteză și de control ale proteinelor matriceale și ale calciului, se remarcă necesitatea implicării multor ioni metalici cum ar fi Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+}, Cu^{+}, Mn^{2+} (în cazul ligninei și matricei polizaharidelor) și a anionului fosfat, figura IX.36. Se poate pune întrebarea dacă toți acești ioni sunt constituiți într-o rețea „feed-back" extinsă și intrinsecă, ce operează asupra ADN-ului, astfel încât să pună la dispoziție apoproteinele necesare obținerii unor sinteze, care se succed armonios în cadrul organismului viu.

În această etapă, creșterea celulară mai necesită ca degradarea matricei să aibe loc la momentul potrivit, pentru a elibera spațiul necesar dezvoltării. Se cunoaște faptul că în acest proces sunt puternic implicate *proteazele* dependente de concentrațiile în zinc și calciu.

Evoluția cercetărilor în domeniu va face ca în curând să fie cunoscute și legăturile genetice dintre ADN și factorii de creștere. Vor indica acestea oare vreo implicare a ionilor metalici liberi în aceste procese?

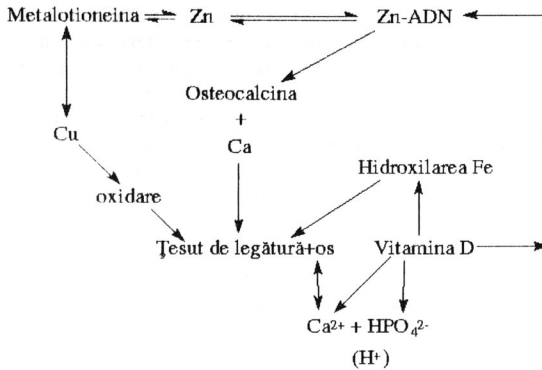


Figura IX.36. Reglarea genelor de către calciu se realizează probabil indirect, prin intermediul fosforilării (kinazelor), defosforilării, fosfatazelor şi a c-AMP. Într-un sistem multicelular avansat, homeostazia are o reţea ce conduce la ţesutul de legătură şi os.

IX.3.8. Chimia coordinativă a proceselor de reglare şi control

Trebuie menţionate aici o serie de trăsături ale chimiei coordinative utilizate mai ales în interpretarea proceselor de reglare din organismele vii. Acestea depind de sinteza controlată a bioliganzilor pentru a putea gestiona preluările selective ale acestora. Astfel vom observa următoarele:

1. În cazul bioliganzilor de tip tiolat din compuşii coordinativi cu Cu(I) şi Zn(II), factorul raza ionică este cel care permite formarea structurilor selective din proteine de tip ACE-1 şi metalotioneine aproape identice. În acest caz cuprul şi zincul ca biocationi vor fi trataţi separat;
2. Utilizarea centrilor *anionici*, pe bază de azot şi oxigen, la realizarea capturării ionului Fe(III) şi semnalizarea prin Fe(II) în sistemele oxidative, dar pe de altă parte şi utilizarea clusterilor ferului Fe_4S_4 în alte mecanisme. Doar ferul, Fe(III)/Fe(II) poate da aceşti clusteri dar, Mn(III) ar putea urma Fe(III) la preluare;
3. Magneziul interacţionează direct cu donorii de O ai scheletului fosfatic din secvenţele de ADN, fiind în mod virtual singurul ion metalic care poate realiza acest lucru;

4. Calciul nu intră probabil în contact cu ADN-ul, nici direct nici indirect prin intermediul bioliganzilor, dar în schimb, modulează sistemul mesager fosfat ce interacționează cu ADN-ul.
5. Sodiul și potasiul influențează ADN-ul în mod diferit, dar principalul lor efect este cel de stabilizare a secvenței polielectrolitice anionice; de asemenea ionii de K^+ pot fi destul de bine prinși în cavitățile formate de secvențele particulare ale ADN-ului.

Această parte complementară a sistemului de reglare interacționează cu o bine cunoscută gamă de funcții metabolice enzimatice sub controlul catalitic direct al ionilor metalici.

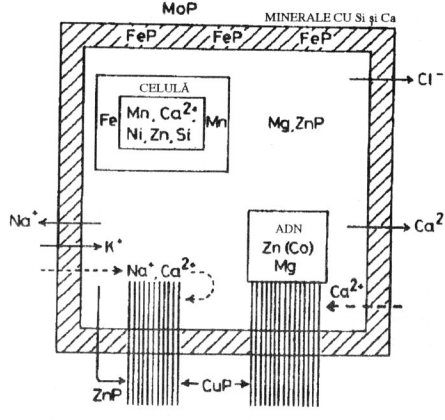


Figura IX.37. Multitudinea de roluri pe care le joacă ionii metalici în mecanismul homeostaziei. Țesutul de legătură este indicat prin intermediul liniilor verticale ce străbat membrana celulară.

Împreună, cationii formează o rețea de comunicare în celulă, care poate fi asemănată unui circuit de calculator cu mulți agenți purtători de curenți diferiți. Trebuie reamintit faptul că acest circuit este doar o parte

din complexul de funcţii pe care le îndeplinesc ionii metalici, ce menţin condiţiile de creştere şi dezvoltare la un nivel homeostatic staţionar. În orice altă parte a celulei există ioni metalici *neschimbabili* ce, deseori, joacă rolul de asistare a transportului de electroni sau de asistare a proceselor de cataliză. Acesta este cazul când unele din metaloproteine trebuie să fie poziţionate exact în raport cu reacţiile metabolismului celular.

În figura IX.37 este schematizat mecanismul care stă la baza chimiei anorganice implicată în procesele vieţii. Rolul jucat de reglarea concentraţiilor proteinelor prin intermediul sintezelor acestora este menţinut în armonie cu mecanismele de preluare şi eliminare a ionilor metalici: mai mult există un proces de control asupra echilibrului formelor sub care se leagă chimic ionul fosfat, punându-se astfel în evidenţă în special rolul complexării cu biocationii în cadrul homeostaziei generale a celulei.

CAPITOLUL X

APLICAŢII ALE CHIMIEI BIOANORGANICE

În prezent s-au conturat câteva domenii de utilizare practică a realizărilor teoretice din chimia bioanorganică, cele mai frecvente fiind în medicină, mai puţin în agricultură (cultura plantelor).

Metodele chimiei bioanorganice au fost destul de eficiente în investigarea ciclurilor biologice ale elementelor toxice, în mediul înconjurător şi în primul rând la interacţia lor cu diferite organisme (bacterii, plante acvatice , ciuperci , plante şi animale). În principiu este posibilă formarea şi evaluarea participării biochimice a ionilor metalici, modificarea şi utilizarea proceselor ce au loc în organismele vii în scopuri industriale (fixarea azotului în condiţii energetice blânde, eliminarea şi divizarea microelementelor .

X.1. Aplicaţii ale chimiei bioanorganice în medicină

Utilizarea chimiei bioanorganice în medicină este bazată în primul rând pe aceea că, concentraţiile (şi cantităţile) de biometale în diferite ţesuturi ale organismelor vii care funcţionează normal, se menţin la un nivel strict determinat, datorită controlului riguros al sistemului alcătuit din proteine şi hormoni.

Biometalele "stocate" în organism se reîmprospătează în mod sistematic; biometalele sunt conţinute în cantităţi mari în hrană şi în apă. Numai în cazuri excepţionale, sunt necesare preparate speciale care conţin unul sau mai multe bioelemente în forme asimilabile de către organismul viu. Dacă aceste bioelemente scad sub un anumit nivel în organism, el se îmbolnăveşte. Deficienţa în fer duce la anemie, carenţa în cupru duce la distrugerea vaselor sanguine, carenţa în zinc micşorează brusc activitatea numeroaselor enzime catalizatori în procesele hidrolitice, carenţa în magneziu conduce la distrugerea ribozomilor.

Excesul în bioelemente poate la rândul său să conducă la boli grave. El apare din cauza perturbării sistemelor care reglează concentraţia bioelementelor. Ca exemplu poate fi dată *boala lui Vilson* cauzată de excesul de cupru care se depune în ficat, în creier şi în rinichi; *sideroza*, boala care apare din cauza unui exces mare de fer în organism. La excesul

de calciu apar precipitări de natură organică sub forma unor "pietre" având ca efect depunerea lor pe pereţii vaselor de sânge.

Un interes deosebit îl prezintă influenţa excesului în ioni de potasiu asupra funcţionării inimii. Excesul lui în exteriorul celulei, la dublu faţă de normal, duce la dereglări severe ale metabolismului şi chiar la moarte. Pe de altă parte mărirea concentraţiei ionilor de potasiu în interiorul celulei nu duce la consecinţe atât de grave.

Modificarea concentraţiei biometalelor în organism are loc din cauza dereglării sistemelor care controlează concentraţia lor. De exemplu, concentraţia în cupru se măreşte de câteva ori în timpul funcţionării defectuoase a ficatului (hepatită epidemică, ciroză) şi în timpul manifestării altor boli, cum ar fi nefrita, psoriazisul, leucemia etc. De aceea, modificarea concentraţiei ionilor de cupru în organism poate fi utilizată în stabilirea diagnosticului şi în urmărirea tratamentului bolii dominante.

Chimia bioanorganică discută interacţia cu biosistemele nu numai a metalelor vieţii, dar şi a altor metale. În legătură cu aceasta, un interes deosebit îl prezintă studierea la nivel molecular a mecanismului de intoxicare cu metale de tipul mercurului, arsenului, bismutlui, plumbului şi beriliului.

Primele patru metale (Hg, As, Bi, Pb) blochează grupările —SH ale proteinelor sau elimină din centrii activi ai enzimelor ioni metalici cum ar fi Cu^{2+} sau Zn^{2+}. Beriliul blochează unele enzime hidrolitice şi se leagă strâns, prin complexare cu acizii nucleici.

Trebuie menţionat că multe preparate medicamentoase conţin liganzi care interacţionează specific cu unele metale sau grupe de metale.

Cel mai simplu, la nivel molecular, poate fi explicată acţiunea substanţelor care leagă selectiv ionii metalici toxici, sau excesul dăunător în biometale. Substanţele de acest tip sunt denumite substanţe dezintoxicante şi acestea trebuie să îndeplinească cel puţin trei cerinţe:

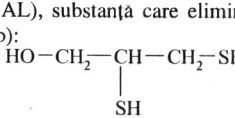
— dezintoxicanţii şi compuşii lor de coordinare cu ionii metalici trebuie să fie netoxici;

— compusul de coordinare al ionului metalic cu dezintoxicantul trebuie să fie mai stabil decât compusul de coordinare al ionului metalic cu gruparea corespunzătoare a apoproteinei;

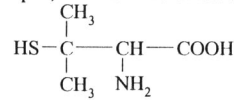
— compusul de coordinare al ionului metalic cu dezintoxicantul trebuie să treacă spre exterior, prin membranele celulare, adică să fie liposolubil.

Vom prezenta câţiva dintre cei mai importanţi dezintoxicanţi.

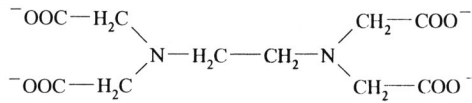
Dimercaprol (BAL), substanță care elimină din organism As, Te, Tl, Hg, Au (dar nu și Pb):



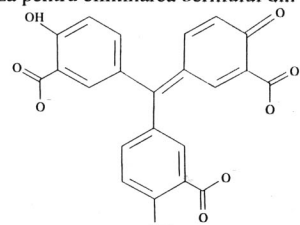
Depenicilamina, substanță care formează un compus de coordinare foarte stabil cu ionii de cupru; se utilizează la tratarea bolii lui Vilson:



Ionul etilendiaminotetraacetat care formează compuși de coordinare stabili cu ionii de plumb și de vanadiu și îi elimină din organism; această substanță este utilizată practic sub forma sării de Na^+ și Ca^{2+} ($Na_2CaEDTA$), cu scopul de a evita legarea și eliminarea Ca din organism. Dacă apare necesitatea terapeutică ca să se micșoreze cantitatea de calciu din sânge (pentru evitarea coagulării sângelui) se folosește sarea fără calciu:



Ionul aurintricarboxilat formează compuși de coordinație stabili cu Be^{2+} și se utilizează pentru eliminarea beriliului din organismul intoxicat.



În același scop se mai poate utiliza și sarea de sodiu a acidului salicilic.

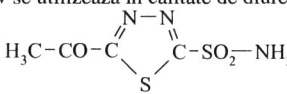
Acidul ferioxamin-β-polihidroxamic, o substanță cu masă moleculară destul de mare, formează chelați stabili cu ionii de fer și îl elimină din organism.

În cazul deficienței metalelor în organism este necesară introducerea lor într-o formă corespunzătoare. De exemplu, ferul se asimilează numai atunci când gradul său de oxidare este +2. De aceea se utilizează $FeSO_4$ sau cuplul Fe^{2+} - acid ascorbic (un reducător puternic).

Acțiunea numeroaselor preparate medicamentoase și a diferiților dezintoxicanți se bazează pe blocarea centrilor activi ai metaloenzimelor. După cum se știe, CN blochează enzimele respiratorii legându-se de ferul situat în poziție centrală.

Disulfiramul $[(C_2H_5)_2N\text{-}CS\text{-}S]_2$ blochează ionul de cupru dintr-o enzimă care catalizează oxidarea alcoolului etilic și se utilizează la tratarea alcoolismului. Introducerea lui în organism face ca alcoolul să se oxideze numai până la acetaldehidă, care se stochează în organism și la consumarea acestuia dă senzații foarte neplăcute și uneori chiar dureroase.

Acetazolamida inhibă specific *carboanhidraza* legându-se de ionii de zinc și din acest motiv se utilizează în calitate de diuretic:



Unii derivați ai hidrazinei inhibă *monoaminooxidaza* care conține ioni de cupru și se utilizează în calitate de stimulator.

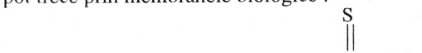
Ionii de K^+, Ca^{2+} și Mg^{2+} joacă un rol foarte important în medicină, cel mai important fiind efectul lor asupra glicozidelor cardiace, care se obțin din *Digitalis* și acționează foarte puternic asupra mușchiului cardiac, ducând la contracții intense și mai puțin ritmice. Dacă apare un exces de glicozide cardiace, poate să aibă loc stoparea completă a activității inimii și uneori chiar moartea organismului. La introducerea în plasma sanguină a ionilor de K^+ și Mg^{2+} activitatea glicozidelor cardiace scade. Ionii de Ca^{2+} mărește activitatea glicozidelor cardiace. Acest fapt poate fi diminuat prin micșorarea concentrației calciului care poate fi obținută, de exemplu prin introducerea în fluidul biologic a EDTA-ului. Mecanismul molecular al acțiunii glicozidelor cardiace și a ionilor alcalini și alcalino-pământoși nu este pe deplin elucidat. Astăzi se lucrează pe compuși model pentru lămurirea tuturor aspectelor.

În literatura medicală există informații cu privire la tratarea psihozei maniaco-depresive prin introducerea în organism a ionilor de Li^+ și Rb^+.

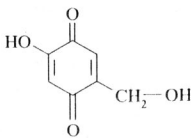
Unii compuşi coordinativi pot fi utilizaţi ca preparate antibactericide şi anticiuperci, o astfel de acţiune potenţială putând avea şi unii liganzi. Vom discuta câteva exemple.

Complexul oxichinolinic al Fe(III) are o acţiune puternică antibactericidă. Este interesant de menţionat că nici ionii de fer şi nici 8-hidroxichinolina liberă nu au o astfel de acţiune. Este posibil ca compusul de coordinare cu raportul 3:1 să treacă prin membranele celulare, având loc în interiorul celulei o descompunere a acestui complex până la un complex mai simplu (cu rapoarte 2:1 sau 1:1, între ionul metalic şi ligand). De cea mai mare activitate biologică este răspunzător compusul de coordinare cu raportul metal-ligand de 1:1.

Activitatea preparatului antituberculos tiacetazona creşte brusc în prezenţa ionilor de cupru, probabil din cauza formării compuşilor de coordinaţie care pot trece prin membranele biologice :



În prezenţa ionilor de cupru creşte şi activitatea antibacterială a acidului coic:



Tetraciclina distruge ribozomii bacteriilor legând ionii de Mg^{2+}. Înmulţirea şi creşterea microorganismelor care a fost stopată de tetraciclină, poate să se reactiveze la adăugarea în organism a ionilor de magneziu.

Mecanismul acţiunii compuşilor de coordinaţie bactericizi şi fungicizi nu a putut fi elucidat pentru fiecare caz în parte. Pot exista cel puţin trei mecanisme ale acţiunii lor:

— activ este ligandul, rolul ionului metalic fiind de a asigura transportul prin fluidul şi ţesutul biologic;

— ionul metalic posedă o activitate biologică proprie, formarea compusului de coordinare fiind necesară, pentru a realiza o activitate de transport prin membrana celulară;

— particulele active sunt ionii complecşi, care pot interacţiona cu situsurile active implicate în procesele vieţii.

Ca exemple putem da, sulfatul de tris(2,2' bipiridil) Fe(II) şi iodura de tris(1,10 fenantrolină) Ru(II). Aceşti compuşi de coordinaţie conduc la o paralizie a organismului viu, care este asemănătoare cu cea care apare în urma acţiunii preparatelor de tip *curara*. Este cunoscut faptul că substanţele toxice de acest tip dezactivează capetele nervilor reacţionând cu acetilcolina $[(CH_3)_3N^+\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}CO\text{-}CH_3]$. Capătul acetilcolinei $N^+(CH_3)_3$ are o sarcină pozitivă şi un diametru de $\approx$ 6,4 Å. Un diametru apropiat au şi compuşii de coordinaţie cationici menţionaţi anterior. Compuşii de coordinaţie neutri din punct de vedere electric nu au un efect important din acest punct de vedere, dar cei cu sarcină pozitivă $[Co(NH_3)_5NO_2]^{2+}$ şi $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ au o acţiune puternică.

În ultimii ani au apărut un număr mare de lucrări ştiinţifice cu privire la substanţele chimice cu o potenţială activitate cancerigenă şi anticancerigenă. Până în anul 1969 investigaţiile s-au efectuat în mare măsură utilizând substanţe organice clasice, dar fără rezultate deosebite. De exemplu, în SUA, până în acest an au fost probate 150.000 de substanţe din care numai 20 erau substanţe anorganice. O schimbare bruscă a cercetărilor în acest domeniu a început în anul 1969 după descoperirea lui Rosenberg şi Van Kampom a activităţii anticancerigene la unii compuşi coordinativi ai Pt.

În acea perioadă a fost stabilită compatibilitatea între activitatea anticancerigenă şi alte două proprietăţi importante ale preparatelor medicamentoase:

— activitatea antibacteriană şi activitatea antivirus;

— capacitatea de a stopa sinteza ADN-ului.

Substanţe diferite ca structură chimică, prezintă o selectivitate în ceea ce priveşte acţiunea, asupra diferitelor forme de cancer.

În timpul investigării substanţelor cu acţiune potenţială anticancerigenă se utilizează o serie de parametri semicantitativi:

—raportul T/C în cazul tumorilor puternice, unde T este masa tumorii de pe porţiunea tratată cu preparat şi C este masa tumorii a porţiunii netratate. Raportul T/C se exprimă în procente, preparatul având perspective aplicative şi în cazul în care T/ C este < 50 % .

— indexul terapeutic TI = LD_{50}/ID_{90} unde LD_{50} este doza preparatului care omoară 50 % din animalele investigate (LD = "lethal dose", doza letală), ID_{90} - doza care duce la inhibarea tumorii în 90 % din cazuri. TI se exprimă în procente .

— ILS - creşterea duratei de viaţă (exprimată în procente) în comparaţie cu durata de viaţă a animalelor investigate. Acest indice se utilizează la investigarea preparatelor utilizate pentru tratarea leucemiei.

Investigarea compuşilor coordinativi ai metalelor din perioada 4-a (metalele tranziţionale 3d) a arătat că numai unele dintre ele pot avea acţiune efectivă în tratarea cancerului. Dintre clorurile simple (necomplexe) o oarecare activitate prezintă numai $ZnCl_2$. Capacitate de a inhiba tumorile canceroase o au sărurile unor acizi carboxilici cu toxicitate mică (de exemplu malonatul de Mn). Rezultate pozitive cu privire la activitatea cancerostatică au fost obţinute la utilizarea unor preparate cu Cu^{2+}. Compuşii Co^{2+} cu cisteina şi feniltioureea au o activitate potenţială cancerostatică. Unele forme de cancer, ca sarcomul lui Wilker sunt sensibile la compuşii de coordinaţie ai cobaltului cu bazele Schiff. În acest caz raportul T/ C este de 21%.

Compus coordinativ $[Cr(NH_3)_4C_2O_4]$ $Cr(NH_3)_2(C_2O_4)_2]$, în care atât cationul cât şi anionul sunt ioni complecşI, inhibă slab unele forme ale cancerului.

Investigaţiile au fost stimulate de o serie de ipoteze cu privire la mecanismul acţiunii preparatelor anticancerigene. Una dintre ele constă în aceea că pentru stoparea creşterii tumorii canceroase este necesar să se blocheze activitatea enzimelor care conduc în mod normal la o creştere rapidă a tumorii.

S. Kursner a plecat de la ipoteza declanşării cancerului de către un virus. El consideră că preparatul anticancerigen poate fi concretizat, prin formarea unui compus coordinativ, care poate bloca virusii şi nu proteina nativă. În calitate de astfel de compuşi el a propus compuşi de coordinaţie ai platinei cu liganzi care conţin atomi de sulf ca atomi donori.

Rosenberg a stabilit în 1969 că cis-$[Pt(NH_3)_2Cl_2]$ duce la creşterea celulelor de Escherichia Coli, dar stopează diviziunea lor. La introducerea acestui compus în cultura lui Escherichia Coli se formează fibre. S-a stabilit că diclorodiammin Pt (II) este un preparat anticancerigen, raportul T/C fiind 1,8 %. În unele cazuri, creşterea sarcomului dispărea definitiv şi avea loc însănătoşirea completă a animalelor de experienţă (a şoarecilor). În ultima perioadă, aceste preparate sunt testate pe animalele superioare. Totuşi, din cauza dereglării activităţii rinichilor apar anumite dificultăţi în administrarea clinică.

Este necesar să menţionăm că o activitate anticancerigenă prezintă numai izomerii *cis* de Pt (II), izomerii *trans* fiind inactivi din acest punct de

vedere. Izomerii *cis* sunt cu mult mai toxici ca izomerii trans analogi, cu toate că reactivitatea chimică a izomerilor *trans* este mai mare.

A fost investigată influenţa asupra tumorilor, a preparatelor terapeutice cu diferite amine (A) şi anioni (X^-) în compuşii de coordinaţie de tip $[PtA_2X_2]$. După cum se ştie, reactivitatea aminelor complexe sintetizate în acest scop variază după seria :

$$NO_3^- > H_2O > Cl^- > Br^- > I^- > SCN^- > NO_2^-$$

Testările au arătat că o activitate anticancerigenă pronunţată au numai compuşii de coordinaţie cu Cl^- şi Br^- ca anioni cu moleculă mică. Cationul hidratat $[PtA_2(H_2O)_2]^{2+}$ este caracterizat printr-o toxicitate foarte mare. Există posibilitatea stabilirii practice a unui criteriu referitor la reactivitatea acestor compuşi: nu sunt efectivi nici anionii prea mobili nici cei prea rigizi.

Vom prezenta în continuare o serie de date privind activitatea cancerigenă a compuşilor de coordinaţie ai platinei cu anionii cu o singură sarcină (monovalenţi).

Tabelul X.1. Activitatea cancerigenă a unor compuşi coordinativi pe bază de platină cu anioni monovalenţi.

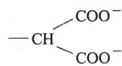
Complecşi	T/ C	Complecşi	T/ C
cis-$Pt(NH_3)_2(NO_3)_2$	54	-	-
cis-$Pt(NH_3)_2Cl_2$	1	$Pt(en)Cl_2$	4
cis-$Pt(NH_3)_2Br_2$	30	$Pt(en)Br_2$	31
cis-$Pt(NH_3)_2I_2$	110	$Pt(en)I_2$	82
cis-$Pt(NH_3)_2(SCN)_2$	70	$Pt(en)(SCN)_2$	83
cis-$Pt(NH_3)_2(NO_2)_2$	90	$Pt(en)(NO_2)_2$	71
cis-$Pd(NH_3)_2Cl_2$	83	$Pd(en)Cl_2$	79
-$Pd(NH_3)_3Cl_3$	17	$Ir(NH_3)_3Cl_3$	73
trans-$Pt(NH_3)_2Cl_2$	85	-	-
trans-$Pt(NH_3)_2Br_2$	110	-	-

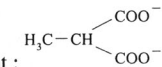
Anionii cu două sarcini negative (oxalat, malonat, metilmalonat) formează compuşi de coordinaţie cu activitate anticancerigenă pronunţată, cu toate că din punct de vedere cinetic ele sunt destul de stabile. Se presupune că are loc o activare enzimatică a lor.

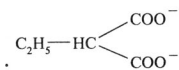
Activitatea anticancerigenă a compuşilor de coordinaţie ai ionilor metalelor platinice cu anionii cu două sarcini se caracterizează prin următoarele valori ale raportului T/C:

Tabelul X.2. Activitatea cancerigenă a unor compuşi coordinativi pe bază de platină., cu anioni monovalenţi.

Complecşi	T/ C	Complecşi	T/ C
$Pt(NH_3)_2C_2O_4$	25	$Pt(en)C_2O_4$	73
$Pt(NH_3)_2$mal	12-20	Pt(en)mal	18
$Pt(NH_3)_2$mmal	7	Pt(en)mmal	4
$Pt(NH_3)_2$etmal	17	Pt(en)etmal	51
$Pd(NH_3)_2$mal	55	Pd(en)mal	75

malonat : 

metilmalonat : 

etilmalonat : 

Compuşii de coordinaţie de tipul $Pt(en)X_2$ se caracterizează prin proprietăţi asemănătoare cu excepţia $Pt(en)C_2O_4$ care este destul de toxic.

S-au efectuat investigări prin modificarea aminelor (A). În acest caz la tratarea sarcomului 180 nu a fost stabilită o dependenţă a mărimii T/C de structura aminei, la acţiunea compusului coordinativ $[PtA_2X_2]$ asupra tumorii canceroase. Pentru alte forme de cancer modificarea structurii radicalului în amina $R\text{-}NH_2$ ridică activitatea anticancerigenă de câteva ori. Substituirea aminelor cu fosfină, dietilsulfură, dimetilsulfură conduce aproape la o pierdere completă a proprietăţilor chimioterapeutice a complecşilor platinici.

Sarcina electrică a ionului complex prezintă o importanţă deosebită, deoarece o activitate anticancerigenă puternică o au numai compuşii de coordinaţie electroneutri.

Există foarte multe confirmări experimentale că *cis*-diaminele de Pt(II) reacţionează cu ADN-ul. Testările biochimice arată că numai ele stopează brusc sinteza ADN-ului (trans-diaminele nu au astfel de proprietăţi); în acest caz sinteza ARN-ului şi a proteinelor se inhibă foarte puţin. Din punct de vedere chimic este greu de explicat acest fenomen deoarece compuşii de Pt(II) ar fi trebuit să reacţioneze cu ARN-ul şi cu proteinele. Probabil că Pt leagă strâns ambele lanţuri de ADN cu toate că nu este exclusă şi posibilitatea legăturilor bidentate ale platinei cu

guanosină sau citidină (prin gruparea NH_2 şi atomul de azot al ionului complex).

Au fost obţinuţi compuşi de coordinaţie de tip $[Pt\ A_2(nucl)_2]$, unde nucl, reprezintă un anion de nucleotidă.

Compuşii de coordinaţie ai altor metale platinice prezintă o activitate anticancerigenă cu mult mai puţin pronunţată. Un compus al Pd(II), cis $[Pd(NH_3)_2Cl_2]$ prezintă o activitate anticancerigenă destul de mică T/C = 83. Asemănător cu complexul proteinic, diaminomalonatul de Pd(II) are caracteristici terapeutice mai bune(T/C =55).

Conform unor date experimentale o perspectivă aplicativă o pot avea compuşii de coordinaţie ai Pd(II) cu O,O'-dinucleotidfosfat (1:2) şi compuşii de coordinaţie ai Pd(II), cum ar fi $[Pd^{IV}(NH_3)_2Cl_4]$.

Compusul coordinativ al rodiului mer-$[Rh(NH_3)_3Cl_3]$ este activ pentru unele forme de cancer, pe când compuşii de coordinaţie de alt tip pe bază de Rh(III) sunt mai puţin activi.

Compuşii de coordinaţie ai Ir(III) nu au practic o activitate anticancerigenă, cu toate că după iradierea lor cu lumină ultravioletă poate să apară o astfel de activitate.

Complexul $[Ru(NH_3)_3]Cl_3$ acţionează asupra Escherichia Coli aproximativ în acelaşi fel ca şi cis $[Pt(NH_3)_2Cl_2]$, dar nu prezintă activitate anticancerigenă.

Din toate cele prezentate până acum reiese că există o serie de aspecte generale, care se aplică cu privire la investigarea preparatelor chimioterapeutice. Dintre ele fac parte :

— investigările interacţiunii preparatului dat cu proteinele, inclusiv metaloproteinele sau acizii nucleici (in vitro);

— liposolubilitatea preparatului care determină capacitatea acestuia de a trece prin membranele biologice;

— acţiunea preparatului dat (in vivo) la valorile pH-ului şi temperaturii strict limitate din organismele vii şi la un spectru mare de liganzi cu activitate biologică potenţială;

— procesele din metabolism legate de preparatul dat, determinarea produşilor metabolismului şi a acţiunii lor în tratament (uneori o acţiune eficientă poate avea nu preparatul ci produsul metabolismului lui);

— determinarea acţiunii suplimentare (parţial toxice) a preparatului sau produşilor metabolismului;

— studiul compatibilităţii preparatului cu organismul adică a interacţiunii lor, unul cu altul;

— adaptabilitatea organismelor cu preparatul dat.

În momentul în care se prescriu în tratament oligoelemente, medicul trebue să țină cont de mai multe aspecte importante în legătură cu prorietățile optime ale oligoelementelor pe care trebuie să le aleagă:

1. Oligoelementele nu trebuie să modifice pH-ul intra/extra celular (trebuie să asigure neutralitatea);
2. Oligoelementele nu trebuie să fie citotoxice, trebuie să nu prezinte toxicitate acută (DL_{50});
3. Oligoelementele nu trebuie să fie asociate cu alte molecule cu rol de transportori cărora nu li se cunosc efectele secundare;
4. Oligoelementele trebuie să fie administrate sub forma unor compuși chimici cât mai simpli posibil astfel încât să nu formeze alte combinații chimice prin coprecipitare;
5. Oligoelementele în caz de neutilizare trebuie să aibe posibilitatea să se elimine din organism;
6. Oligoelementele trebue să asigure o excelentă biodisponibilitate;
7. Oligoelementele trebuiesc asociate cu un mediu steril și natural.

Au fost necesari mai mulți ani de cercetări pentru a pune la punct metodele fizico-chimice moderne și rapide, conforme cu preocupările medicale.

Din aceste motive au fost aleși și fabricați printr-o serie de procedee acoperite de brevete, „hidrații metalici". De fapt un „hidrat metalic" reprezintă un cation hidratat (aquacation) asociat cum ar fi: $Mg^{2+}2HO^{-}$ — $Fe^{3+}3HO^{-}$. Această reprezentare este în acord total cu echilibrul biochimic și fizico-chimic din mediul celular.

În cazul administrării oligoelementelor acide, ele deplasează cationii spre exteriorul membranelor sărăcind mediul celular (nucleul și citoplasma conținând metale și nemetale indispensabile.

Administrarea de oligoelemente foarte bazice provoacă coprecipitări cu diferiți anioni ca: carbonat, sulfat, fosfat. Oligoelementele asociate zaharurilor (oze) sau gluconaților pot provoca fenomene de biodegradare ireversibilă. Aceste afirmații au fost demonstrate de o serie de cercetări de specialitate. În patologia cancerului digestiv gluconații de cupru pot provoca arderi energice, cuprul dipozitiv fiind un oxidant puternic, care poate produce grupări carboxil -COOH.

Biodisponibilitatea oligoelementelor este direct legată de distribuția spațială a moleculei și deci de mobilitatea cationului.

— hidroxizii corespund perfect la aceste criterii fizico-chimice (un singur cation, o protonare a moleculei de apă);

— biodisponibilitatea este legată de raportul masei atomice a cationului față de masa moleculară a transportorului de natură organică;

— s-a constatat că cea mai mare parte a sărurilor chimice comercializate ca oligoelemente sunt asociate cu alte molecule a căror masă moleculară este de două, trei ori mai mare decât greutatea metalului activ, astfel conducând la o biodisponibilitate mai scăzută.

— aquaionii fiind produse pure, se evită posibilele efecte secundare ale moleculelor cu biodegradabilitate scăzută și care pot să fie toxice pentru mediul celular.

— testele de citotoxicitate și citostaticitate a aquaionilor s-au dovedit nule.

— studiile de toxicitate acută a aquaionilor (DL_{50}) s-au dovedit negative.

În concluzie utilizarea aquaionilor metalelor dă posibilitatea medicilor să administreze oligoelemente selecționate foarte strict, fabricate practic fără toxicitate și cu o biodisponibilitate mare.

X.2. Aplicațiile chimiei bioanorganice în agricultură

Un alt domeniu de utilizare practică a rezultatelor obținute de chimia bioanorganică este agricultura și în primul rând cultura plantelor.

În ultimele decenii a fost stabilită o metodologie de lucru pentru protecția plantelor. Din cauza pH-ului ridicat al solurilor, multe elemente chimice printre care și ferul formează carbonați și hidroxizi greu solubili care nu pot fi asimilați de către plante. Evident că în aceste condiții adăugarea compușilor pe bază de fer în sol nu are efect, datorită faptului că ei sunt eliminați imediat din faza solubilă, din cauza formării compușilor anorganici insolubili.

Utilizarea reactivilor din categoria liganzilor polidentați de tip complexon a oferit o posibilitate reală pentru transferul Fe din insolubil sub forma compusului de coordinație cu Fe(III) stabil și solubil, care poate trece ușor prin membrana celulară. Pentru prima dată în acest scop a fost utilizat EDTA-ul. Un efect pozitiv în lupta cu fenomenul numit cloroză, poate fi observat numai în soluri slab acide. Compușii de coordinație ai ferului cu EDTA-ul, în mediu bazic, nu sunt destul de stabili [precipită $Fe(OH)_3$].În lupta cu cloroza plantelor, sunt eficienți complexonii, cum ar

fi: dietilentriaminpentaacetat (DTPA), trietilentetraaminpentaacetat (TTPA) etc. Aceşti liganzi polidentaţi formează cu Fe(III) compuşi de coordinaţie, care au constante de stabilitate de trei până la patru ori mai mari decât constantele de stabilitate ale compuşilor de coordinaţie cu EDTA-ul. O stabilitate deosebită o prezintă complexul Fe(III) cu DTPA-ul şi alţi liganzi analogi, acest compus fiind utilizat cu succes în practica agricolă. La alegerea agenţilor de complexare este necesar să se ţină cont nu numai de stabilitatea compuşilor de coordinaţie cu Fe(III), dar şi de alţi factori cum ar fi, stabilitatea faţă de microorganisme, toxicitate mică pentru plante şi absenţa toxicităţii complexonaţilor şi metaboliţilor lor pentru oamenii şi animalele, care utilizează produsele vegetale pentru hrană.

Pentru eliminarea deficienţei în zinc din plante se utilizează chelaţii pe bază de zinc.

X.3. Aplicaţii ale chimiei bioanorganice în protecţia mediului

Metodele stabilite de chimia bioanorganică pot fi utilizate cu succes la rezolvarea unor probleme foarte importante cum ar fi, prevenirea poluării mediului ambiant cu elemente chimice şi cu combinaţiile lor toxice şi stabilirea metodelor de luptă împotriva poluanţilor de acest tip.

Activitatea omului a modificat într-un mod important raportul dintre diferitele substanţe în mediul înconjurător. Sistemele biologice care reglează concentraţia diferitelor elemente şi a combinaţiilor lor în natură (tabel X.3), nu reuşesc să se adapteze rapid la noul mediu ambiant creat, acest aspect fiind problema majoră şi actuală a mediului înconjurător.

Tabelul X.3 Viteza eliminării metalelor din sol (tone/ an)

Elementul	Viteza „geologică" V_g	Viteza eliminării de om în natură V_h	V_h / V_g
Fer Fe	$2,5.10^7$	$3,2.10^7$	12,8
Cupru Cu	$3,8.10^5$	$4,5.10^6$	11,8
Zinc Zn	$3,7.10^5$	$3,9.10^6$	10,5
Plumb Pb	$1,8.10^5$	$2,3.10^6$	12,5
Mangan Mn	$4,4.10^5$	$1,6.10^6$	3,6
Staniu Sn	$1,5.10^3$	$1,7.10^5$	1,3
Molibden Mo	$1,3.10^4$	$5,7.10^4$	4,4
Mercur Hg	3.10^3	7.10^3	2,3
Argint Ag	5.10^3	7.10^3	1,4

Este necesar să se analizeze prezenţa diferitelor substanţe în mediul înconjurător, în urma activităţii umane, interacţiunea lor cu organismele vii la diferite nivele şi stabilirea unui sistem de acţiuni eficiente care sunt îndreptate pentru prevenirea poluării avansate a mediului înconjurător şi pentru obţinerea unor mijloace biologice de protecţie.

Elementele care se găsesc în mediu pot fi împărţite în toxice şi netoxice, cu toate că o astfel de împărţire este relativă. Se ştie că excesul aşa-numitelor elemente "netoxice" în organism, cum ar fi ferul duce la sideroză, iar excesul metalului vieţii cupru, duce la intoxicări grave. Cele mai toxice elemente pentru organismele vii sunt situate în sistemul periodic al lui Mendeleev destul de compact, aşa cum se va vedea în tabelul X.4.

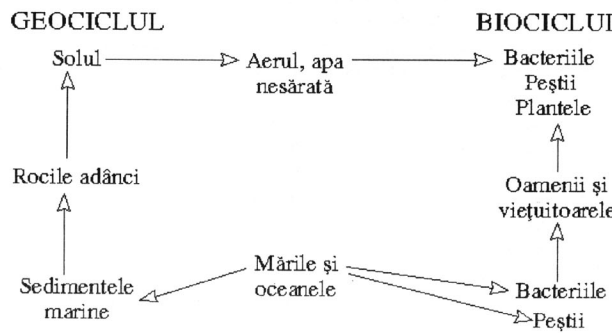
Printre metalele cu o toxicitate ridicată şi de o răspândire destul de mare putem enumera mercurul, plumbul şi cadmiul. Mercurul ajunge în mediul înconjurător de la întreprinderile electrochimice (electrozi de mercur şi amalgam) şi electrotehnice. În gazele automobilelor poate să se elimine şi plumbul. Conform unor date statistice recente, poluarea apelor de suprafaţă cu plumb, în emisfera boreală, s-a mărit în ultimul deceniu de zece ori. Poluarea mediului înconjurător cu cadmiu poate fi legată de activitatea industriei siderurgice şi atomice. Metalele platinice pot apărea în mediul ambiant din cauza utilizării unor catalizatori utilizaţi în industria petrolieră, iar ruteniul radioactiv, poate să se formeze în timpul descompunerii unor topituri de combustibili nucleari.

Tabelul X.4 Situarea elementelor toxice în sistemul periodic

Perioada	Grupa						
	VIII-a A (10)	I-a B (11)	II-a A-B (2) şi (12)	III-a A (13)	IV-a A (14)	V-a A (15)	VI-a A (16)
2	-	-	Be	-	-	-	-
4	Ni	(Cu)	(Zn)	-	-	As	Se
5	Pd	Ag	Cd	-	Sn	Sb	Te
6	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	-

Un rol important în poluarea mediului ambiant de către diferitele elemente toxice, îl joacă apariţia în bazinele acvatice a complexonilor şi a altor potenţiali liganzi, care sunt obţinuţi la scară industrială. Prezenţa în bazinele acvatice a complexonilor poate duce la solvirea precipitatelor de săruri şi hidroxizi metalici sedimentaţi şi la transferul prin formarea

compușilor de coordinație ai ionilor metalici, în forme care pot trece ușor prin membranele biologice penetrând astfel în organismele peștilor și animalelor. Complexonații metalici (uneori și complexonii) dacă ajung în organism pot cauza o serie de consecințe grave cum ar fi apariția tumorilor mutagene și dezechilibrarea echilibrului de substanțe minerale. Compușii metalici menționați în acest capitol iau parte atât la ciclul geologic cât și la cel biologic al elementelor chimice a căror scheme sunt prezentate în continuare :



Toxice pot fi chiar și metalele vieții, dacă concentrația lor este destul de mare și ele sunt prezente în organism în forme care pot fi ușor asimilate, adică sub forma unor substanțe ce sunt compuși cu o selectivitate suficientă în fază apoasă și în grăsimi („potențialul biocumulativ").

Este suficient să stabilim pentru elementele toxice formele în care ele sunt prezente (compuși chimici) în sol, sedimentele marine și în râuri, în ape și în aer. Se pot observa așa-numitele cicluri biologice (sau metabolice) adică reciclarea lor cu participarea organismelor vii.

Pentru ciclurile biologice cu participarea mercurului, caracteristică este reacția de metilare. Ea decurge cu participarea în calitate de agent de metilare a vitaminei B_{12} sau a altor substanțe analoage care are în structura ei gruparea Co^{III}-CH_3 care reacționează conform schemei :

$$CH_3-\left[Co^{III}\right] + Hg^{2+} \rightarrow (CH_3)Hg^{+} + \left[Co^{III}\right]$$

Gruparea Co^{III}-CH_3 captează cationii Hg^{2+} formând cationul $(HgCH_3)^+$ (cationul metilmercuric) şi ulterior compusul $Hg(CH_3)_2$. Compuşii metilaţi ai mercurului sunt caracterizaţi de o toxicitate ridicată (neurotoxicitate) din cauza capacităţii lor de a trece uşor prin membranele celulare.

Ciclurile biologice analoage cu cele ale mercurului pot fi observate şi pentru staniu, paladiu, platină, aur etc. Nu suferă proces de metilare compuşii plumbului, zincului, cadmiului şi cuprului. În figura X.1 este prezentat ciclul biologic pentru arsen şi mercur.

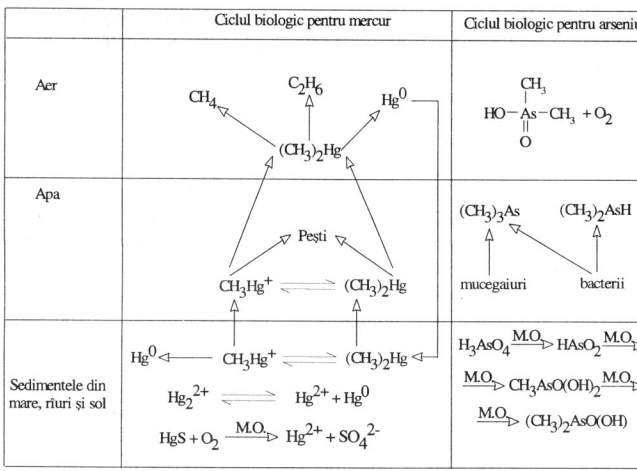


Figura X.1. Ciclul biologic al mercurului şi arseniului (M.O. = microorganismele ; $(CH_3)_2AsO(OH)$ = acidul dimetilarsenic (cacodilic)

Reacţia de metilare în acest ciclu cu participarea microorganismelor şi mucegaiurilor nu are un rol semnificativ. În urma cercetărilor efectuate la sfârşitul anilor 60, a fost stabilită stocarea în condiţii improprii a compuşilor metilarsenici în unele fiorduri din Norvegia.

Asemănător cu compuşii arsenului ar fi trebuit să se comporte în diferite biocicluri seleniul, telurul şi sulful.

Pentru chimia bioanorganică prezintă un mare interes şi problema poluării atmosferei cu compuşi nemetalici simpli, care sunt prezenţi în mediul înconjurător în cantităţi destul de mari (tabelul X.5).

Apariţia excesului unor substanţe ca CO_2, azotaţi, azotiţi, săruri de amoniu şi fosfaţi solubili, influenţează foarte mult toată biosfera şi în special vegetaţia.

Oxizii azotului şi carbonului pot interacţiona cu unele metaloproteine modificând esenţial centrele lor active (blocarea prin legare de ionul metalic cu modificarea gradului lui de oxidare).

Utilizarea metodelor chimiei bioanorganice la investigarea unei probleme deosebit de importante cum este interacţiunea organismelor vii cu mediul înconjurător, mult modificat sub influenţa activităţii omului este în plină actualitate.

Factorii enumeraţi ne indică cât de importante pot fi aceste investigări. Se poate presupune că în viitorul apropiat utilizarea metodelor chimiei bioanorganice în rezolvarea acestei probleme va lua o mare dezvoltare.

În final putem afirma că un interes practic important îl pot prezenta şi unele aspecte ale *biomimetizării* proprii chimiei bioanorganice, adică studierea proceselor chimice care se petrec cu participarea organismelor vii, cu modelarea lor şi într-o oarecare măsură reproducerea lor în condiţii de laborator sau condiţii industriale.

Tabelul X.5. Poluanţi anorganici în mediul înconjurător.

Compusul nemetalic simplu	Cantitate (tone/ an)
CO_2	9.10^9
CO	2.10^8
SO_2	8.10^7
C_nH_n	8.10^7
NO_x	5.10^7
Azot legat (îngrăşămintele)	1.10^7
Fosfaţi solubili (îngrăşăminte şi detergenţi)	$6{,}5.10^6$

Procesele de acest tip pot fi modelarea unor procese cum ar fi cele ale reţinerii reversibile ale oxigenului molecular în scopul obţinerii acumulatorilor specifici de oxigen. În ultimul timp se acordă o mare atenţie şi modelării proceselor de fixare reductivă chimică şi biologică a N_2

molecular în condiţii blânde, asemănătoare celor din lumea vie. În acest caz este posibil de reprodus nu numai procesul de obţinere din dinitrogen a amoniacului dar şi a altor compuşi pe bază de hidrogen şi azot cum ar fi hidrazina şi a unor heterocicli cu azot.

Un mare interes îl prezintă investigarea mecanismului de concentrare al unor microelemente preţioase din apa de mare sau din alte surse naturale.

Se ştie că plantele de mare elimină din apa de mare iodul şi îl concentrează în organismul lor; ele pot fi utilizate ca sursă industrială pentru obţinerea iodului.

Factorii de îmbogăţire pentru unele microelemente în diferitele organisme vii din planctonul marin se caracterizează prin valori de ordinul 10^5-10^6 (valori destul de mari au fost găsite pentru factorii de concentrare ai cadmiului, mercurului şi plumbului).

Pot fi prezentate în final şi succesele *metalurgiei microbiologice*, care constă în utilizarea microorganismelor pentru obţinerea unor elemente preţioase din roci. Deci este posibilă utilizarea acestor extrase atât în condiţii industriale cât şi în condiţii de laborator.

Ca exemplu a utilizării industriale a *metalurgiei microbiologice* pot fi enumerate următoarele procese metabolice: extragerea cuprului din calcopirită (în patru zile se extrage circa 80 % cupru), extragerea manganului din rocile sărace (se extrage 97,5 % mangan când în roca avem aproximativ 4 %) şi desfacerea concentratului arsenoproteic cu scopul de a obţine aur şi de a-l elibera de urmele de arsen etc.

Mecanismele de concentrare microbiologică a microelementelor şi multe procese de transferare a lor în microorganisme nu au putut fi studiate până în prezent la nivel molecular şi în acest domeniu sunt deschise nelimitate posibilităţi în utilizarea metodelor chimiei bioanorganice.

Toate exemplele discutate în acest capitol nu pot epuiza însă posibilităţile utilizării practice a ideilor şi metodelor specifice chimiei bioanorganice, care în mod cert aparţine viitorului.

1. Albu C.D., Brezeanu M., *Mică enciclopedie de chimie*, Editura Enciclopedică Română, Bucureşti, 1974.
2. Anghel I., Mitrofan L., *Lecţii de genetică,* Casa de editură Scaiul SRL, Bucureşti,1995.
3. Anghel I., *Citologie vegetală,* Eitura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 979.
4. Atanasiu L., Polescu L., *Fotosinteza sau cum transformă plantele lumina soarelui*, Editura Albatros, Bucureşti, 1988.
5. Artenie Vl., *Biochimie*, Editura Universităţii "Al.I.Cuza" Iaşi, 1991.
6. Avram M., *Chimie organică,* volumul 1 şi 2, Editura Academiei, Bucureşti, 1983.
7. Auger N., *Contribution a la Modelation du site actif de degagement d'oxygène des plantes: synthese et ètude des propriétés électroniques de complexes trinucleaires comprenant le coeur* $[Mn_3O_4]^{4+}$, Thèse présentée pour obtenir le titre de Docteur en Science, Université de Paris Sud Orsay, 1991.
8. Bădilescu I., Bădilescu S., *Legătura de hidrogen*, Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1981.
9. Banciu S.A., Ciacoi-Dimitriu D., *Descoperiri epocale în biochimie*, Editura Albatros, Bucureşti, 1990.
10. Brezeanu M., Spacu P. , *Chimia combinaţiilor complexe*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1974.
11. Bedeleanu D.D., Manta I., *Biochimie medicală şi farmaceutică,* vol. 1, Biochimie structurală, Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1985.
12. Brezeanu M., Cristureanu E., Antoniu A., Marinescu D., Andruh M., *Chimia metalelor*, Editura Academiei Române, 1990.
13. Bünzli J.C.G., *Chimie generale III*, Institut de chimie minérale et analytique, Lausanne, 1989, p.197.
14. Bünzli J.C.G., *Chimie minerale II*, Institut de chimie minérale et analytique, Lausanne, 1989.
15. Blondin G., Girerd J.J., Meunier B., *Chimie bioinorganique*, Ecole Polytechnique Palaiseaux, France, 1996.
16. Cucuianu M., *Biochimie clinică,* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1977.

17. Cristescu D., *Bacterii şi enzime în biotehnologia ţesutului colagenic*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1989.
18. Cojocaru, D.C., *Biochimia vitaminelor*, Editura Gama, Iaşi, 1996.
19. Cowan J.A., *Inorganic Biochemistry*, John Wiley&Sons, 1997
20. Cuiban F., Lupea A.X., *Studiul structurii şi sinteza peptidelor*, Editura Academiei, Bucureşti, 1989.
21. Cotton F.A., Wilkinson G., Gaus P.L., *Basic Inorganic Chemistry*, John-Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.
22. Cohen G., *Le metabolisme cellulaire et sa regulation*, Herman, Paris, 1967.
23. Danciu F., Kory M., Lupuţiu G., *Structură chimică, biodisponibilitate,* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1983.
24. Dinu V., Truţia E., Cristea-Popa E., Popescu A., *Biochimie medicală,* Bucureşti, 1996.
25. Dumitru I.F., *Biochimie*, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1980.
26. Eichhorn G.L., *Inorganic Biochemistry*, Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1975.
27. Gheorghiu Tr., Grossu T., Săhleanu V., *Intoducere în biofizică,* Editura Ştiinţifică, Bucureşti, 1967.
28. Grecu I., Enescu I., Neamţu M., *Implicaţii biologice şi medicale ale chimiei anorganice*, Editura Junimea, Iaşi, 1982.
29. Grecu I., Monciu D. ,*Structura cristalină şi biodisponibilitatea substanţelor medicamentoase*, Editura Medicală, Bucureşti, 1984.
30. Huheey J.E., *Inorganic Chemistry, Principles of structure and reactivity*, Harper & Row, Publishers, New York, 1990.
31. Hay R.W., *Bio-Inorganic Chemistry*, Ellis Harwood Limited, New York, 1987.
32. Hendrikson J.B., Cram D.J., Hammond G.S., *Chimie organică,* Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1976.
33. Jolly W.L., *Modern Inorganic chemistry*, McGraw-Hellbook Company, New York, 1985.
34. Iaţimirsky K.B., *Vvedenie v bio-neorganiceskuiu himiu,* Izd. "Naukova Dumka" Kiev, 1976.
35. Iordan A.R., Palamaru M.N., Cecal Al., *Introducere în chimia compuşilor de coordinaţie*, Editura Tehnopress, Iaşi, 1997.
36. Jerghiuţă S., Ţivlea J., Covrig A., Ilucă D., *Chimia şi viaţa*, Editura Document, Iaşi, 1997.

37. Kaim W., Schwederski B., *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, John- University Press, Oxford, 1995.
38. Lehninger A. L., *Biochimie*, Volumul 1., Editura Tehnică, Bucureşti, 1987.
39. Lehninger A. L., *Biochimie*, Volumul 2., Editura Tehnică, Bucureşti, 1992.
40. Lippard S.J., Berg J.M., *Principles of Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, Mill Valley, California, 1994.
41. Lippard S.J., *Progress in Inorganic Chemistry: Bioinorganic chemistry*, vol.38, John- Wiley & Sons, Inc., New York,1990.
42. Marcu Gh. , *Sodiul*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1996.
43. Marcu Gh., *Chimia compuşilor coordinativi*, Editura Academiei, Bucureşti, 1984.
44. Mărgineanu O., Miu N., *Oligomineralele în biologie şi în patologie,* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1984.
45. Mărgineanu G.D., *Energetica lumii vii*, Casa de Editură "Edimpex-Speranţa" SRL, Bucureşti, 1992.
46. Monod J. ,*Hazard şi necesitate*, Humanitas, Bucureşti, 1991.
47. Martynenko L.I., Spitsyn V.I., *Metodological Aspects of the Course in Inorganic chemistry,* Mir Publisher Moskow, 1986.
48. Moţoc I., *Structura moleculelor şi activitatea biologică,* Editura Facla, Timişoara, 1980.
49. Mihele D., Pavlovici M., *Biochimie clinică, metode de laborator*, Editura Medicală, Bucureşti, 1996.
50. Macovschi E., *The confirmation of the biostructural theory by the high voltage electron microscopy*, Editura Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti, 1981.
51. Maximilian C, Ioan D.M., *Genetică Medicală,* Editura Medicală, Bucureşti, 1986.
52. Negoiu D. , *Oxigenul*, Editura Tehnică, Bucureşti, 1996.
53. Neamţu G., Cîmpeanu G., Enache A., *Dicţionar de biochimie vegetală,* Editura Ceres, Bucureşti, 1989.
54. Neamţu G., Câmpeanu G., Socaciu C., *Biochimie vegetală*,partea structurală, Eitura Didactică şi Pedagogică, R.A., Bucureşti, 1993.
55. Neamţu G., Câmpeanu G., Socaciu C., *Biochimie vegetală,* partea dinamică, Eitura Didactică şi Pedagogică,R.A., Bucureşti, 1995.
56. Neamţu G., *Biochimie vegetală,* Editura Ceres, Bucureşti, 1981.

57. Nenițescu C.D., *Chimie organică,* vol.1, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980.
58. Nenițescu C.D., *Chimie organică,* vol.1, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1980.
59. Nenițescu C.D., *Chimie generală,* Editura Didactică și Pedagogică, București, 1972.
60. Olinescu R., *Peroxidarea în chimie, biologie și medicină,* Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1982.
61. Olinescu R., Greabu M. , *Chemiluminescența și bioluminescența,* Editura Tehnică, București, 1987.
62. Olinescu R., *Radicali liberi în fiziopatologia umană,* Editura Tehnică, București, 1994.
63. Pauling L., *Chimie generală,* Editura Științifică, București, 1972, 701.
64. Palamaru M.N., Iordan A.R., Cecal Al., *Chimie bioanorganică și metalele vieții,* Editura Bit, Iași, 1997.
65. Pamfil C., *Întrebări și răspunsuri din genetică,* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1980.
66. Roman L., Bârzu O., *Implicații biomedicale ale combinațiilor complexe,* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
67. Rusu V., Baran T., Brănișteanu D.D., *Biomembrane și patologie,* volumul 1, Editura Medicală, București, 1988.
68. Rusu V., Baran T., Brănișteanu D.D., *Biomembrane și patologie,* volumul 2, Editura Medicală, București, 1991.
69. Rudic V.F., *Aspecte noi ale biotehnologiei moderne,* Știința, Chișinău, 1993.
70. Răileanu M., *Rolul solvenților în chimie,* Editura Academiei, București, 1988.
71. Rousseau J.J., *Cristallographie géométrique et radiocristallographie,* Masson, Paris, 1995.
72. Ravikanth M., Chendrashekar T.K., *Structure and Bonding, Nonplanar Porphyrins and their Biological Relevance: Ground and Excited State dynamics,* Editors M.J. Clarke, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995.
73. Sähleanu V., Stugren B., *Mică enciclopedie de biologie și medicină,* Editura Științifică și Enciclopedică, București, 1976.
74. Simon Z.,*Biochimie cuantică și interacțiuni specifice,* Editura Științifică, București, 1973.

75. Ştirban M., *Procese primare în fotosinteză,* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1981.
76. Szent-Györgyi A., *Bioenergetica,* Editura Ştiinţifică, Bucureşti, 1962.
77. Străjescu M, Teodor F., *Elemente de chimie bioanorganică,* Editura Dacia, Cluj-Napoca, 1979.
78. Străjescu M., Vicol M.,Jeleriu S., Mărgineanu F., *Fixarea azotului,* Editura Tehnică, Bucureşti, 1987.
79. Schäffler A., Altekrüger I., *Microbiologie medicală,* Editura ALL, Bucureşti, 1996.
80. Sălăgeanu N., Atanasiu I., *Fotosinteza,* Editura Academiei, Bucureşti, 1981.
81. Şerban M., Câmpeanu G., Ionescu E., *Metode de laborator în biochimia animală,* Editura Didactică şi Pedagogică, R. A., Bucureşti, 1993.
82. Shriver D.F., Atkins P.W., Langford C.H., *Inorganic Chemistry,* Oxford University Press, Oxford, 1990.
83. Simiti I., Schwartz I., *Structură chimică, activitate biologică,* Editura Dacia, Cluj, 1974.
84. Tamaş V., Neamţu G., *Pigmenţi carotenoidici şi metaboliţi,* Editura Ceres, Bucureşti, 1986.
85. Thaxton C. B., Bradley W. L., Olson R. L., *Misterul originii vieţii, reevaluarea teoriilor actuale,* Philosophical Library, New York, 1984.
86. Toma C., Niţă M., *Celula vegetală,* Editura Universităţii, Iaşi, 1995.
87. Trautwein A.X., *Bioinorganic Chemistry,* John Wiley&Sons, 1997
88. Vasilescu V., Mărgineanu D.G., *Introducere în neurobiofizică,* Editura ştiinţifică şi enciclopedică, 1979.
89. Vevera V., *Fiziopatologia şi clinica fierului,* Editura Medicală, Bucureşti, 1978.
90. Zewail A., *The Chemical Bond, Structure and Dinamics,* Academic Press, Inc., 1992.
91. Zeana C., *Magneziul, biologie, clinică, tratament,* Editura enciclopedică, Bucureşti, 1994.
92. ***, *Biofizica, probleme actuale,* Editor Petre Frangopol, Casa de editură "Edimpex-Speranţa" SRL, Bucureşti, 1992.
93. ***, International Programe on Chemical Safety, Environmental Heath Criteria 108, *Nickel,* World Health Organization, Geneva, 1991.

94. *** *Probleme actuale de chimie*, vol.II, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1968, p.154.
95. *** *Silicon biochemistry*, Ciba Foundation Symposium 121, John Wiley&Sons, 1986, p. 140.
96. *** *Biochemistry of Silicon and Related problems*, Edyted Gerd Bendz and Ingvar Lindquist, Plenum Press, New York, 1978.
97. ***Biomedical frontiers of fluorine chemistry, Edyted by Owao Ojima, James R. McCarthy and John T. Welch, ACS Symposium Series 639, 1996.
98. ***Perspectives in Coordination Chemistry, Editors Alan F. Williams, Carlo Floriani, Andre E. Merbach, VCH, 1992.

RÉSUMÉ

Ce travail a été conçu comme un moyen de plus pour documentation dans le domaine de la chimie moderne. Dans la littérature roumaine de spécialité il y a peu de livres dans ce domaine. Par rapport aux autres apparitions notre monographie diffère par son contenu et par sa présentation.

Les auteurs sont enseignants dans le cadre du département de Chimie Inorganique de la Faculté de chimie de l'Université "Al. I. Cuza" Iaşi. Ce travail a eu comme point de départ le cours de Chimie bioinorganique enseigné aux étudiants dans le cadre des spécialisations Biochimie Appliquée et Chimie.

Pour l'élaboration de ce livre, M. le professeur Mircea PALAMARU, chargé du cours de Chimie Bioinorganique a effectué deux courts stages de documentation à l'Université Paris Sud Orsay dans les années 1995 et 1997. Les auteurs expriment toute leur gratitude à M. le Dr. Jean-Jacques GIRERD, spécialiste de marque dans ce domaine, directeur du Laboratoire de Chimie Inorganique de l'Université Paris Sud Orsay pour toute son aide accordé.

Ce livre représente une continuation des informations présentées dans leur monographie déjà apparue en 1997 aux éditions BIT, Iaşi.

Dans ce livre sont présentés des aspects modernes liés aux méthodes classiques et modernes d'investigation de la structure et des propriétés de composés de coordination impliqués dans les processus indispensables à la vie, les mécanismes des processus d'hydrolyse et redox, les composés de coordination des acides nucléiques, les applications actuelles de la chimie bioinorganique.

Cette monographie s'adresse aux chercheurs qui travaillent dans le domaine de la chimie bioinorganique, à d'autres spécialistes intéressés aux problèmes liés aux organismes vivants et surtout aux étudiants.

TABLE DES MATIÈRES

PRÉFACE 5
AVANT PROPOS 7
CHAPITRE I. Introduction 9
I.1. Chimies organique et inorganique 9
I.2. Chimie bioinorganique 10
I.3. Les oligo-éléments 14
I.4. Les macroéléments 15
I.5. Perspectives de éléments essentiels en traces 15
I.6. Le concept d'élément essentiel 17
I.7. L'évolution des (oligo-éléments) éléments en traces 19
I.8. Eléments en traces possibles 22
I.9. Lantanides et actinides 22
I.10. Comment actionnent dans les organismes vivantes les éléments essentiels en micro traces ? 22
I.11. Les métalloenzymes 24
I.12. Les nonmétaux 28
I.13. L'iode et les hormones thyroïdiennes 29
I.14. L'antagonisme des éléments en traces (oligo-éléments) 32

CHAPITRE II. Les principaux ligands biologiques 34
II.1. De molécules ou des anions simples 34
II.2. Les chaînes latérales des aminoacides 35
II.3. Des ligands spécialement synthétisés pour "emprisonner" les ions métalliques 36

CHAPITRE III. Les caractéristiques générales des composés de coordinations des biometaux avec les ligands biologiques 39

CHAPITRE IV. La liaison chimique dans les composés de coordinations des bio métaux 59

CHAPITRE V. Méthodes physiques pour étudier la structure des composés de coordinations des biométaux avec ligands biologiques 76
V.1. Spectroscopie röngenographique (des rayons X) et photoélectronique 78

V.2. Spectroscopie de vibration 80
V.3. Spectroscopie d'absorption en ultraviolet et visible 81
V.4. Dispersion optique rotatoire et dichroïsme? circulaire 87
V.5. Détermination de la susceptibilité magnétique 88
V.6. Résonance paramagnétique électronique 90
V.6.1. Effets d'un champ magnétique sur un état de spin électronique non nul 93
V.6.2. Système anisotropes 95
V.6.3. Couplage hyperfin 97
V.6.4. Systèmes de spin électronique supérieur à 1/2 99
V.6.4.1. Cas d'une distorsion axiale forte pour un ion Fe(III). Spectre RPE de la metmyoglobine 102
V.6.4.2. Un ion de Fe(III) en symétrie rhombique 103
V.6.4.3. Un Fe(III) hémique non axial : le cytochrome P_{450} 106
V.7. Résonance magnétique nucléaire 107
V.7.1. Spectroscopie ENDOR 109
V.7.1.1. Les systèmes couplés 112
V.8. Spectroscopie de résonance par rayons γ 115
V.9. Spectroscpie EXAFS 115
V.10. Détermination de la structure à l'aide d'une sonde spectrale 118
V.10.1. L'utilisation de l'ion Eu(III) 119

CHAPITRE VI. Les fonctions biologiques des bioéléments 124
VI.1. Structure moléculaire du dioxygène 125
VI.1.1. L'activation de la molécule de dioxygène 130
VI.1.1.1. L'oxygène singlét 131
VI.1.1.2. L'obtention de l'oxygène singlét 132
VI.1.1.3. Méthodes pratiques pour l'obtention de l'oxygène singlét 133
VI.1.1.3.1. Méthodes physiques 133
VI.1.1.3.2. Méthodes chimiques 133
VI.1.1.3.3. La méthode de la photosensibilisation 134
VI.1.1.3.4. L'obtention de l'oxygène singlét dans les organismes vivantes 135
VI.1.1.3.5. L'identification de l'oxygène singlét 135
VI.1.2. Radicaux libres de la molécule de dioxygène 136

VI.1.2.1. L'ion radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ 138
VI.1.2.2. Le radical hydroxyle HO• 142
VI.1.2.3. Le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 143
VI.1.3. Le processus d'autooxydation et péroxydation 145
VI.1.3.1. L'action nocive des radicaux libres de l'oxygène pour la matière vivante 148
VI.2. L'oxygène moléculaire, ligand dans les biocomposés de coordinations 149
VI.3. Protéines qui fixent réversible le dioxygène 154
VI.3.1. La myoglobine et l'hémoglobine 154
VI.3.1.1. Propriété spectroscopiques 157
VI.3.1.2. Modèles chimiques 159
VI.3.2. L'hémérytrine 160
VI.3.2.1. Modélisation de l'hémérytrine 162
VI.3.3. L'hémocyanine 163
VI.3.3.1. Modélisation de l'hémocyanine 165

CHAPITRE VII. Métalloenzymes, catalyseurs pour les processus hydrolytiques 169

CHAPITRE VIII. Les réaction de transfert d'électron 178
VIII.1. Théorie du transfert d'électron 178
VIII.1.1. Influence de ΔG^0 sur l'entalpie libre d'activation d'une réaction adiabatique. Relation croisée de Marcus 181
VIII.1.2. Vérification expérimentale 184
VIII.2. Le transfert d'électron en biochimie 186
VIII.2.1. Etude expérimentale de l'interaction cytc/cyt b_5. Effet de l'ergonicité de la réaction sur la vitesse de réaction 187
VIII.2.2. Les cytochromes 189
VIII.3 Métalloenzymes, catalyseurs pour les processus rédox 190
VIII.3.1. Protéines qui contient cuivre 198
VIII.3.2. La vitamine B_{12} 200
VIII.3.3. L'activation du dinitrogène 201
VIII.4. La conversion H_2O/O_2. Photosynthèse et respiration 203
VIII.4.1. La photosynthèse. Introduction 204
VIII.4.2. La photosynthèse dans les plantes et les bactéries 206

VIII.4.2.1. Dans les plantes 206
VIII.4.2.2. Dans les bactéries 208
VIII.4.3. Aspects particuliers de la photosynthèse 209
VIII.4.3.1. Le centre réactionnel : une photopile 209
VIII.4.3.2. Le rôle du manganèse dans le dégagement d'oxygène 210
VIII.4.4. La respiration 217
VIII.5. Modélisation chimique de la photosynthèse 219
VIII.5.1. La séparation de charges 220
VIII.5.2. Dégagement d'hydrogène moléculaire 221
VIII.5.3. Dégagement de dioxygène 222
VIII.5.4. Photolyse de l'eau 222
VIII.6. Quelques métalloenzymes utilisant O_2 ou H_2O_2 comme oxydant 223
VIII.6.1. Une monoxygènase du reticulum endoplasmique: Cyt P_{450} 223
VIII.6.2. Des bactéries très jalousées 226
VIII.6.3. La Ribonucléotide-Réductase 229
VIII.6.4. Utilisation de l'eau oxygénée 231
VIII.6.5. Les peroxydases 232
VIII.6.6. Les catalases 233
VIII.6.7. Modélisation chimique des mono-oxygénases 236
VIII.6.7.1. Cytochrome P-450. Modélisation structurale 236
VIII.6.7.2. Cytochrome P-450. Modélisation fonctionnelle 237
VIII.6.7.3. Modélisation de la MMO et de la RNP 238

CHAPITRE IX. Métallopolynucléotides 241
IX.1. Généralités 241
IX.2. ADN et endonucléases artificielles 248
IX.2.1. Coupure d'ADN double-brin via la formation d'une triple hélice avec un complexe "oligonucléotide-Fe-EDTA" 258
IX.2.2. Aspects moléculaire des coupures d'ADN par $MnTMPyP/KHSO_5$ 264
IX.2.3. Activité biologique de molécules hybrides „porphyrine cationique de magnèse-vecteur" 266
IX.3. Composés de coordinations et acides nucléiques 270
IX.3.1. Principes de base 270
IX.3.2. Acides nucléiques et les ions Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} 275

IX.3.3. L'ADN et le fer 279
IX.3.4. Schémas généraux pour la régulation avec métalloprotéines 281
IX.3.5. Le couplage des gènes (linkage) 283
IX.3.6. Le zinc et la régulation 284
IX.3.7. La régulation de la concentration en cuivre 287
IX.3.8. La chimie de coordination et les processus de régulation et contrôle 289

CHAPITRE X. Applications de la chimie bioinorganique 292
X.1. Applications de la chimie bioinorganique en médecine ... 292
X.2. Applications de la chimie bioinorganique en agriculture .. 303
X.3. Applications de la chimie bioinorganique dans la protection de l'environnement 304

BIBLIOGRAPHIE 310

RÉSUMÉ 316

CUPRINS

PREFAŢĂ 5
CUVÂNT ÎNAINTE 7
CAPITOLUL I. Introducere 9
I.1. Chimia organică şi anorganică 9
I.2. Chimia bioanorganică 10
I.3. Oligoelemente 14
I.4. Macroelemente 15
I.5. Perspective ale elementelor esenţiale, în urme 15
I.6. Conceptul de element esenţial 17
I.7. Evoluţia elementelor în urme 19
I.8. Posibile elemente esenţiale în urme 22
I.9. Lantanide şi actinide 22
1.10. Cum lucrează în organismele vii elementele esenţiale în microurme ? 22
I.11. Metaloenzimele 24
I.12. Nemetale 28
I.13. Iodul şi hormonii tiroidieni 29
I.14. Antagonismul elementelor esenţiale în urme 32
CAPITOLUL II. Principalii liganzi biologici 34
II.1 Molecule sau anioni simpli 34
II.2. Catenele laterale ale aminoacizilor 35
II.3. Liganzi sintetizaţi special pentru a "prinde" ionii metalici ... 36
CAPITOLUL III. Caracteristicile generale ale compuşilor coordinativi ai biometalelor cu bioliganzii 39
CAPITOLUL IV. Legătura chimică în compuşii coordinativi ai biometalelor 59
CAPITOLUL V. Metode fizice utilizate în studiul structurii compuşilor coordinativi ai biometalelor cu bioliganzii 76
V.1 Spectroscopia röngenoelectronică şi fotoelectronică 78
V.2. Spectroscopia de vibraţie 80
V.3. Spectroscopia de absorbţie în domeniile ultraviolet vizibil .. 81
V.4. Dispersia optică rotatorie şi dicroismul circular 87
V.5. Determinarea susceptibilităţii megnetice 88
V.6. Rezonanţa paramagnetică electronică 90
V.6.1. Efectele câmpului magnetic asupra stării de spin

electronic diferite de zero 93
V.6.2. Sisteme anizotrope 95
V.6.3. Cuplarea hiperfină 97
V.6.4. Sisteme cu spin electronic mai mare de 1/2 99
V.6.4.1. Cazul unei distorsiuni axiale puternice pentru un ion Fe(III). Spectrul RPE al metmioglobinei 102
V.6.4.2. Ion de Fe(III) în simetrie rombică 103
V.6.4.3. Fe(III) hemic neaxial: citocromul P_{450} 106
V.7. Rezonanţa magnetică nucleară 107
V.7.1. Spectroscopia ENDOR 109
V.7.1.1. Sistemele cuplate 112
V.8. Spectroscopia de rezonanţă cu raze γ 115
V.9. Spectroscopia EXAFS 115
V.10. Determinarea structurii folosind sonde spectrale 118
V.10.1 Utilizarea ionului Eu(III) 119
CAPITOLUL VI. Funcţiile biologice ale bioelementelor 124
VI.1. Structura moleculară a dioxigenului 125
VI.1.1. Activarea moleculei de dioxigen 130
VI.1.1.1. Oxigenul singlet 131
VI.1.1.2. Obţinerea oxigenului singlet 132
VI.1.1.3. Metode practice pentru obţinerea oxigenului singlet.. 133
VI.1.1.3.1. Metode fizice 133
VI.1.1.3.2. Metode chimice 133
VI.1.1.3.3. Metoda fotosensibilizării 134
VI.1.1.3.4. Obţinerea oxigenului singlet în organismele vii 135
VI.1.1.3.5. Identificarea oxigenului singlet 135
VI.1.2. Radicali liberi ai moleculei de dioxigen 136
VI.1.2.1. Ionul radical superoxid, $O_2^{\bullet-}$ 138
VI.1.2.2. Radicalul hidroxil, HO• 142
VI.1.2.3. Peroxidul de hidrogen, H_2O_2 143
VI.1.3. Procesul de autooxidare şi peroxidare 145
VI.1.3.1. Acţiunea nocivă a radicalilor liberi ai oxigenului asupra materiei vii 148
VI.2. Oxigenul molecular ca ligand în biocompuşii de coordinare 149
VI.3. Proteine care fixează reversibil dioxigenul 154
VI.3.1 Mioglobina şi hemoglobina 154

VI.3.1.1. Proprietăţi spectrale 157
VI.3.1.2. Modele chimice 159
VI.3.2. Hemeritrina 160
VI.3.2.1.Modelarea hemeritrinei 162
VI.3.3. Hemocianina 163
6.3.3.1.Modelarea hemocianinei 165
CAPITOLUL VII. Metaloenzime, catalizatori ai proceselor hidrolitice. 169
CAPITOLUL VIII. Reacţii cu transfer de electroni 178
VIII.1. Teoria transferului de electroni 178
VIII.1.1. Influenţa lui ΔG^0 asupra entalpiei libere de activare a unei reacţii adiabatice. Relaţia încrucişată a lui Marcus 181
VIII.1.2. Verificarea experimentală 184
VIII.2. Transferul electronului în biochimie 186
VIII.2.1. Studiu experimental al interacţiei cyt c/ cyt b_5. Efectul de ergonicitate al reacţiei asupra vitezei de reacţie 187
VIII.2.2. Citocromii 189
VIII.3. Metaloenzimele, catalizatori ai reacţiilor redox 190
VIII.3.1. Proteine care conţin cupru 198
VIII.3.2. Vitamina B_{12} 200
VIII.3.3. Activarea dinitrogenului 201
VIII.4. Conversia H_2O/O_2. Fotosinteza şi respiraţia 203
VIII.4.1. Fotosinteza. Aspecte introductive 204
VIII.4.2. Fotosinteza în plante şi bacterii 206
VIII.4.2.1. În plante 206
VIII.4.2.2. In bacterii 208
VIII.4.3. Aspecte particulare ale fotosintezei 209
VIII.4.3.1. Centrul de reacţie : o pilă fotochimică 209
VIII.4.3.2. Rolul ionilor de mangan în procesele de degajare a dioxigenului 210
VIII.4.4. Respiraţia 217
VIII.5. Modelarea chimică a fotosintezei 219
VIII.5.1. Separarea sarcinilor 220
VIII.5.2. Degajarea hidrogenului molecular 221
VIII.5.3. Degajarea dioxigenului 222
VIII.5.4. Descompunerea fotochimică a apei 222
VIII.6. Câteva metaloenzime care utilizează O_2 sau H_2O_2 ca oxidant 223

VIII.6.1. O monoxigenază a reticulului endoplasmatic: Citocromul P-450 223
VIII.6.2. Bacterii cu specificitate înaltă 226
VIII.6.3. Ribonucleotid-Reductaza 229
VIII.6.4. Utilizarea apei oxigenate 231
VIII.6.5. Peroxidazele 232
VIII.6.6. Catalazele 233
VIII.6.7. Modelarea chimică a monooxigenazelor 236
VIII.6.7.1. Citocromul P-450. Modelare structurală 236
VIII.6.7.2. Citocromul P-450. Modelare funcţională 237
VIII.6.7.3. Modelarea MMO-ului şi a RNR 238
CAPITOLUL IX. Metalopolinucleotide 241
IX.1. Aspecte generale 241
IX.2. ADN şi endonucleazele artificiale 248
IX.2.1. Separarea ADN lanţ dublu, cu formarea unei elice triple, prin intermediul unui complex „oligonucleotidă-Fe-EDTA" 258
IX.2.2. Aspecte moleculare ale ruperilor ADN prin intermediul $MnTMPyP/KHSO_5$ 264
IX.2.3. Activităţi biologice ale moleculelor „hibride " porfirină cationică cu vector, mangan 266
IX.3. Compuşii coordinativi şi acizii nucleici 270
IX.3.1. Principii de bază 270
IX.3.2. Acizii nucleici şi ionii de Na^+, K^+, Mg^{2+} şi Ca^{2+} 275
IX.3.3. ADN-ul şi ferul 279
IX.3.4. Scheme generale de reglare cu metaloproteine 281
IX.3.5. Cuplarea genelor (linkage) 283
IX.3.6. Zincul şi reglarea 284
IX.3.7. Reglarea concentraţiei cuprului 287
IX.3.8. Chimia coordinativă a proceselor de reglare şi control .. 289
CAPITOLUL X. Aplicaţii ale chimiei bioanorganice 292
X.1. Aplicaţii ale chimiei bioanorganice în medicină 292
X.2. Aplicaţiile chimiei bioanorganice în agricultură 303
X.3. Aplicaţii ale chimiei bioanorganice în protecţia mediului. 304
BIBLIOGRAFIE 310
RÉSUMÉ 321

În viitor, omenirea are nevoie mai ales de hrană și îmbrăcăminte, care nu vor putea fi obținute fără aportul bioanorganicii. De asemenea, va duce în continuare o luptă dură cu problemele poluării planetei albastre. Modelarea biocatalizatorilor și realizarea tuturor proceselor chimice în condiții energetice cât mai coborâte, proprii lumii vii, a devenit o necesitate.

Cartea se adresează în primul rând studenților și apoi tuturor celor interesați de chimia compușilor coordinativi în general și a celor cu implicații biologice în special.

ISBN 973-9312-34-9